



Périodes critiques pour la croissance et le développement mammaire lors d'une alimentation obésogène chez la lapine et la souris : implication de la leptine

Catherine Hue-Beauvais

► To cite this version:

Catherine Hue-Beauvais. Périodes critiques pour la croissance et le développement mammaire lors d'une alimentation obésogène chez la lapine et la souris : implication de la leptine. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2014. Français. NNT : 2014VERS0027 . tel-01165100

HAL Id: tel-01165100

<https://theses.hal.science/tel-01165100>

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES
Ecole doctorale des Génomes aux Organismes

THESE

Spécialité : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Catherine HUE-BEAUVAIS

Le 16 décembre 2014

Pour l'obtention du diplôme de
Docteur de l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Périodes critiques pour la croissance et le développement mammaire lors d'une alimentation obésogène, chez la lapine et la souris : Implication de la leptine

Devant le jury composé de :

Pr. Bernard MIGNOTTE (Université Versailles Saint Quentin en Yvelines)	Président
Pr. Didier VIEAU (Université de Lille)	Rapporteur
Dr. Luc MARLIER (CNRS-Université de Strasbourg)	Rapporteur
Dr. Marion BOUTINAUD (INRA Rennes)	Examineur
Dr. Jean-Luc VILOTTE (INRA Jouy en josas)	Examineur
Dr. Eve DEVINOY (INRA Jouy en josas)	Directeur de thèse
Dr. Madia CHARLIER (INRA Jouy en josas)	Encadrante

REMERCIEMENTS

Ce travail a commencé au sein de l'unité de Génomique et Physiologie de la Lactation et s'est poursuivi dans l'équipe de Génomique Fonctionnelle et Physiologie de la Glande Mammaire, de l'unité de Génétique Animale et Biologie Intégrative, à l'INRA de Jouy-en-Josas.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à :

Monsieur Bernard Mignotte pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Messieurs Luc Marlier et Didier Vieau pour avoir évalué ce travail et avoir accepté d'en être les rapporteurs.

Madame Marion Boutinaud et Monsieur Jean-Luc Vilotte pour avoir accepté d'être les examinateurs de mon jury.

Je remercie enfin Mesdames Eve Devinoy et Madia Charlier pour avoir encadré cette thèse et m'avoir témoigné tant de confiance et d'amitié durant toutes ces années. Ces quelques mots ne suffiront pas à vous exprimer ma gratitude et mon affection.

Je remercie Florence Jaffrezic et Denis Laloë pour leur aide précieuse dans l'analyse statistique des résultats, Johann Laubier et Emmanuelle Koch pour les analyses par RT-PCR en temps réel, Delphine Rousseau qui a analysé la composition en acides gras du lait et Johan Castille pour son implication dynamique dans le projet souris. Je tiens également à remercier tous les membres de l'Unité Commune d'Expérimentation Animale sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Enfin je remercie Pascale Chavatte-Palmer et Fabienne Le Provost pour leurs conseils et discussions éclairés.

Je souhaite également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail avec une attention particulière pour Etienne, Laurent, Nico, Marie-Elisabeth et mon « doudou » officiel, pour leur amitié et leur soutien. A Cortex, responsable ô combien, mais pas coupable...si ce n'est d'avoir toujours été là. Un immense merci à tous ceux, famille et amis, que je ne pourrai pas citer, mais vers qui mes pensées s'envolent à l'écriture de ces mots.

A Chris pour ton soutien quotidien indéfectible et ton enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. A toi et aux M&M's sans qui rien ne serait possible et ma vie beaucoup moins belle.

Périodes critiques pour la croissance et le développement mammaire lors d'une alimentation obésogène, chez la lapine et la souris : Implication de la leptine

L'alimentation des femmes, durant l'enfance et la puberté peut influencer ultérieurement leur développement mammaire et leur allaitement, ainsi que la composition de leur lait. A plus long terme, les effets d'une alimentation maternelle inappropriée à différentes périodes critiques peuvent compromettre le développement du fœtus et la santé de l'enfant, puis de l'adulte. Des études ont mis en évidence des phénomènes similaires chez des animaux, mais des interrogations majeures persistent quant à l'existence de périodes nutritionnelles critiques et quant aux mécanismes responsables des perturbations induites par l'alimentation. La leptine constitue un bon candidat au rôle de chef d'orchestre de ces transformations car elle est présente au niveau de nombreux organes, reflète le statut nutritionnel de la mère et est susceptible d'agir sur le fœtus et/ou le nouveau-né.

Ce travail poursuit un double objectif : 1) déterminer s'il existe des fenêtres critiques de sensibilité à l'alimentation, autres que la puberté et 2) mieux caractériser les mécanismes sous-jacents, peu documentés, dans deux modèles animaux : le lapin et la souris.

Dans un premier temps nous avons décrit, chez la lapine, le développement de la glande mammaire à différents stades physiologiques et étudié l'expression et la localisation de la leptine dans la glande mammaire au cours de ce développement. Nous avons ainsi montré que la production mammaire de leptine était peu élevée durant la gestation puis augmentait en début de lactation pour atteindre son expression maximale à mi-lactation.

Notre laboratoire avait montré l'influence de l'obésité, induite par la consommation régulière d'un régime riche en sucres et en graisses, depuis la puberté, sur le développement de la glande mammaire à mi-gestation chez la lapine. Dans un deuxième temps, nous nous sommes proposés d'étendre au stade néonatal la fenêtre nutritionnelle critique et d'étudier le rôle de la leptine dans les phénotypes mammaires induits par cette alimentation. Nous avons montré que, chez le lapin, l'allaitement par une mère hyper adipeuse potentialise les effets d'un régime obésogène ultérieur, et induisent un développement mammaire anormal observé dès les stades précoces de la gestation chez les descendants. Nous avons également mis en évidence la synthèse et la sécrétion locale de leptine par les cellules mammaires de lapines ayant été alimentées par un régime obésogène et l'activité de cette protéine dans un modèle cellulaire hétérologue.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons recherché si les altérations des phénotypes décrites ci-dessus pouvaient également être induites chez la souris. Nous avons ainsi utilisé deux lignées de souris, FVB/N et C57BL/6J après administration d'un régime obésogène. Dans ce contexte nous avons évalué la variation intra espèce due au fond génétique ainsi que les paramètres de croissances selon deux fenêtres nutritionnelles : alimentation obésogène administrée à partir de la puberté ou dès la période néonatale, chez la souris.

L'ensemble de ce travail montre que le lait maternel, dont la composition est altérée par l'alimentation de la mère, influe sur la croissance et le développement mammaire de la descendance, chez le lapin. Ce travail souligne également l'importance de l'utilisation de différents modèles animaux lors de travaux étudiant la nutrition, le développement et la reproduction.

Critical periods for the growth and the mammary development with an obesogenic food supply, in rabbit and mouse models: implication of the leptin

Women's nutrition during childhood and puberty can have long-term effects on mammary development and breastfeeding ability, inducing variations in milk composition. Inappropriate maternal feeding during various critical periods, have an impact on the development of the fetus and the health of the child and the adult. Several studies have highlighted similar phenomenon in animal models, but major additional questions persist concerning the existence of critical nutritional periods and the underlying mechanisms. Leptin may play a major role during these transformations because it is present in numerous organs, it reflects the nutritional status of the mother and it may act on the fetus and/or the newborn.

This PhD project has challenged the existence of critical windows of food sensitivity, other than the puberty. Underlying mechanisms, which had not been frequently documented before, have been tackled in two animal models: the rabbit and the mouse.

Firstly, we describe, the rabbit mammary gland development at various physiological stages, as well as the expression and the localization of leptin in the mammary gland during this development. We show that the mammary synthesis of leptin only slightly increases during pregnancy, but largely increases at the beginning of lactation to reach its maximal expression at the mid-lactation.

Our laboratory had previously shown that obesity, induced by a high fat-high sugar diet, since the puberty, modifies mammary gland development at mid-gestation in the rabbit. We have thus extended to the neonatal stage the nutritional window and have studied the role of leptin in the mammary phenotypes induced by the obesogenic feeding on the offspring. We show that, in the rabbit, milk consumption from obesogenic-fed dams promote the later effects of an obesogenic diet, and lead to an abnormal mammary development observed from the early stages of the gestation in the offspring. We also highlight the synthesis and the local secretion of leptin by the mammary epithelial cells in culture and the activity of this protein in a heterologous cellular model.

Finally, we have characterized the effects the consumption of an obesogenic diet from the puberty on the mammary development at mid-pregnancy, in two lineages of mice, FVB/N and C57BL /6. We have evaluated the intra-species variability induced by the genetic background as well as the growth parameters according to two nutritional windows: obesogenic feeding from the puberty or from the neonatal period, in mouse.

This work shows that the consumption of maternal milk, whose composition is altered in obesogenic fed dams, influences the growth and the mammary development of the offspring, in rabbit. This work also underlines the importance of using various animal models in nutrition, development and reproduction studies.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS	11
INTRODUCTION	13
1. LA GLANDE MAMMAIRE	14
1.1. Développement, structure et fonction	14
1.1.1. Développement au cours de la vie	14
1.1.2. Structure de la glande mammaire en lactation	17
1.1.2.1. Les cellules épithéliales mammaires	17
1.1.2.2. Les cellules myoépithéliales	20
1.1.2.3. Les cellules progénitrices	20
1.1.2.4. Les adipocytes	21
1.1.3. Production et composition du lait	22
1.2. Contrôle hormonal du développement mammaire	24
1.2.1. Principales hormones et facteurs de croissance	24
1.2.2. Cas particuliers de la superovulation et de la pseudogestation	27
1.2.2.1. La pseudogestation chez la souris	28
1.2.2.2. La pseudogestation chez la lapine	29
1.3. Les spécificités de la glande mammaire de lapine	30
1.4. Les spécificités de la glande mammaire de la souris	32
1.5. Modèles permettant l'étude de la glande mammaire	32
1.5.1. Les lignées mammaires immortalisées	33
1.5.2. Les cellules souches mammaires	34
1.5.3. La culture primaire des cellules épithéliales mammaires	35
1.5.4. Cas particulier de la culture primaire des cellules épithéliales mammaires de lapin	37
2. EFFETS DE L'ALIMENTATION SUR LA GLANDE MAMMAIRE	39
2.1. Perturbations du développement mammaire induites à la puberté	39
2.1.1. Cas de la sous nutrition	39
2.1.2. Cas de la surnutrition	40
2.2. Perturbations du développement mammaire induites pendant la gestation	42
2.2.1. Cas de la sous nutrition	42
2.2.2. Cas de la surnutrition	43
2.3. Perturbations du développement mammaire induites durant la lactation	44
2.3.1. Cas de la sous nutrition	45
2.3.2. Cas de la surnutrition	45
3. LA LEPTINE	48
3.1. Généralités	48
3.2. Récepteurs et transduction du signal	50
3.3. Principales fonctions	56
3.3.1. Métabolisme des adipocytes	56
3.3.2. Prise alimentaire	57
3.3.3. Rôle immunitaire	58
3.3.4. Rôle au niveau du tractus digestif	58
3.3.5. Reproduction	59

3.3.6.	Développement néonatal	60
3.4.	Dialogues endocriniens	61
3.4.1.	Leptine et insuline	62
3.4.2.	Leptine et corticoïdes	62
3.4.3.	Leptine et adiponectine	63
3.4.4.	Leptine et prolactine	63
3.4.5.	Leptine et Neuropeptide Y	63
3.4.6.	Leptine et Pro-opiomélanocortine	64
3.5.	Cas particulier de la production de leptine par la glande mammaire	64
3.5.1.	Présence de la leptine dans le lait	66
3.5.2.	Rôle du lait dans la programmation métabolique	67
OBJECTIFS DE LA THESE		69
OBJECTIF 1 :	70
OBJECTIF 2 :	71
OBJECTIF 3 :	71
MATERIEL & METHODES.....		73
1.	CHOIX DES MODELES ANIMAUX	74
1.1.	Le modèle lapin :	74
1.2.	Le modèle souris :	75
2.	MODELES <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i>	77
2.1.	Lapins.....	77
2.1.1.	Régimes	77
2.1.2.	Cohortes	77
2.2.	Souris	78
2.2.1.	Régimes	78
2.2.2.	Cohortes	80
2.3.	Modèles <i>in vitro</i>	82
2.3.1.	Cultures primaires de cellules mammaires	83
2.3.2.	Culture de cellules rénales embryonnaires humaines HEK293T	84
3.	SUIVI DES ANIMAUX.....	85
3.1.	Croissance et prise alimentaire.....	85
3.2.	Composition corporelle des lapins	86
3.3.	Prélèvements et mesures des paramètres métaboliques	86
3.3.1.	Prélèvements de sang	86
3.3.2.	Prélèvements de lait	87
3.3.3.	Dosages de paramètres métaboliques	87
3.3.4.	Biopsies mammaires	87
4.	TECHNIQUES PERMETTANT L'ETUDE DU PHENOTYPE MAMMAIRE	88
4.1.	Montages <i>in toto</i> de glandes mammaires	88
4.2.	Histologie	89
4.3.	Extraction des ARNm et des protéines	89
4.4.	Quantification des transcrits par RT-PCR quantitative (RT-PCRq)	89
4.5.	Analyse des protéines par western blot	90
5.	ANALYSES STATISTIQUES.....	92

RESULTATS	93
1. ANALYSE MORPHOLOGIQUE DU DEVELOPPEMENT MAMMAIRE ET EXPRESSION DE LA LEPTINE DANS LA GLANDE MAMMAIRE DE LAPINE.....	94
1.1. Etude morphologique du développement mammaire chez la lapine	94
1.2. Etude du gène de la leptine chez le lapin : clonage et expression dans les cellules épithéliales mammaires pendant la gestation et la lactation : Publication 1	96
2. EFFETS COMBINES D'UN LAIT DE MERE T OU OB ET D'UNE ALIMENTATION HYPERLIPIDIQUE ET HYPERGLUCIDIQUE SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE CHEZ LE LAPIN.....	106
2.1. Etude des « effets combinés lait+ régime » sur la croissance des lapins.....	107
2.1.1. Prise de poids et croissance	107
2.1.1.1. Au sevrage	107
2.1.1.2. A partir du sevrage	108
2.1.2. Composition corporelle	110
2.1.3. Paramètres métaboliques	111
2.1.4. Discussion	112
2.2. Etude des « effets combinés lait+ régime » sur le phénotype mammaire à 8 jours de gestation : Publication 2.....	116
2.3. Etude <i>in vitro</i> des variations des voies de signalisation Ob-R/MAPK/STAT3 induites par les produits de sécrétion des cultures primaires de glande mammaire de lapines nourries avec un régime obesogène, depuis la puberté jusqu'à 11 jours de gestation	147
2.3.1. Etude des voies de signalisation de la leptine dans les organoïdes mammaires de lapines	147
2.3.2. Etude des voies de signalisation de la leptine dans des cellules HEK293T transfectées avec l'Ob-Rb	152
3. ETUDE DES EFFETS D'UN REGIME OBESOGENE SUR LE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE DANS DEUX SOUCHES DE SOURIS	157
3.1. Effets d'un régime obesogène administré depuis la puberté, sur deux souches de souris	157
3.1.1. Effets sur la croissance et le métabolisme	157
3.1.1.1. Courbes de croissance et prise alimentaire.....	157
3.1.1.2. Etude des paramètres métaboliques.....	158
3.1.2. Effets sur la reproduction	160
3.1.3. Effets sur le phénotype mammaire à mi-gestation.....	163
3.1.3.1. Analyses morphologique du développement mammaire.....	163
3.1.3.2. Expression des protéines du lait dans des extraits mammaires à mi-gestation	167
3.1.3.2. Expression des transcrits codant la leptine et ses récepteurs.....	168
3.2. Etude des « effets combinés lait + régime », sur deux souches de souris	171
3.2.1. Effets de l'alimentation néonatale sur la croissance	171
3.2.2. Effets combinés lait + régime sur la croissance et le métabolisme.....	173
3.2.2.1. Courbes de croissance	173
3.2.2.2. Etude des paramètres métaboliques.....	175
3.2.3. Effets sur le phénotype mammaire à mi-gestation.....	177
3.3. Discussion	178
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	193
ANNEXES.....	209

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES (2011-2014).....	210
PUBLICATIONS	211

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac anticorps
ACTH adrénocorticotrophine
ADNc ADN complémentaire
AG Acides gras
ARNm ARN messenger
BSA Bovine Serum Albumin
CEM Cellule épithéliale mammaire
Chol Cholestérol
EDTA acide éthylène diamine tétraacétique
EGF Epidermal Growth Factor
EGF-R Epidermal Growth Factor Receptor
ER- α Estrogen Receptor-alpha
FGF Fibroblast Growth Factor
g gramme
Glc glycémie
GAPDH glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GH Growth Hormone
h heure
IGF-I Insulin-like Growth Factor-I
IL Interleukin
IMC Indice de Masse Corporelle
IRS Insulin Receptor Substrate
JAK Janus Kinase
l litre
MAPK Mitogen-Activated Protein kinase
MEC Matrice Extra Cellulaire
mg milligramme
min minute
NPY Neuropeptide Y
Ob-R Récepteur de la leptine
pb Paire de bases

PBS Phosphate Buffer Saline (Tampon Phosphate)
PCR Polymerase Chain Reaction
Pg Progestérone
PI3K Protein Phosphatidylinositol 3-Kinase
PL Placental lactogen
POMC pro-opiomélanocortine
PRL Prolactin
PRLR Prolactin Receptor
RCIU Retard de croissance intra-utérin
Régime M25 Régime d'élevage
Régime OB Régime obésogène
Régime T Régime témoin
RT Transcription inverse
sec seconde
SH2 Src Homology 2
SOCS Suppressor of Cytokine Signaling
STAT Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS-T Tampon Tris additionné de Tween
TG Triglycérides
TGF Transforming Growth Factor
TNF Tumor Epidermal Growth Factor or Necrosis Factor
TOBEC Total Body Electric Conductivity
WAP whey acidic protein

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma général du développement mammaire, illustré par des montages *in toto* de glandes mammaires de lapine

Figure 2 : Schéma d'un acinus mammaire

Figure 3 : Schéma d'une cellule épithéliale mammaire en lactation

Figure 4 : Principales adipokines sécrétées par les adipocytes

Figure 5 : Comparaison de la composition du lait de différentes espèces de mammifères

Figure 6 : Représentation schématique des hormones impliquées dans le développement de la glande mammaire

Figure 7 : Répartition des prévalences de l'obésité masculine et féminine depuis 1997

Figure 8 : Modélisation de la structure tridimensionnelle (d'après Zhang., 1997) de la leptine et comparaison des séquences protéiques entre différentes espèces

Figure 9 : Représentation schématique des différentes isoformes du récepteur de la leptine et des mutations chez les rongeurs

Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines du récepteur Ob-Rb chez la souris

Figure 11 : Voies de signalisation du récepteur de la leptine

Figure 12 : Leptine et échanges fœto-maternels

Figure 13 : Description des cohortes de lapins utilisés pour l'étude des effets combinés d'un lait issu de femelles nourries avec un régime témoin ou obésogène et d'une alimentation témoin ou obésogène, sur la croissance

Figure 14 : Comparaison de la composition des régimes des souris

Figure 15 : Description des cohortes de souris alimentées avec les différents régimes depuis la puberté (cohorte 1)

Figure 16 : Description des différents groupes de souris de la cohorte 2

Figure 17 : Anticorps utilisés pour les expériences de western blot

Figure 18 : Développement de la glande mammaire de lapine

Figure 19 : Poids moyens des lapereaux au sevrage

Figure 20 : Croissance à partir du sevrage des femelles et des mâles issus de mères nourries avec le régime témoin, en fonction du régime ingéré en post sevrage

Figure 21 : Croissance des femelles et des mâles issus de mères nourries avec le régime témoin en fonction du lait ingéré en période néonatale

Figure 22 : Poids et adiposité des lapins allaités avec un lait issu de femelles nourries avec le régime témoin ou le régime obésogène et nourris avec ces mêmes régimes après le sevrage

Figure 23 : Dosages des triglycérides, du cholestérol et de la glycémie à jeun chez les lapines à 7 mois d'âge

Figure 24 : Observation en microscopique optique des organoïdes mammaires en culture

Figure 25 : Effet d'une stimulation par la PRL des organoïdes mammaires en culture

Figure 26 : Etude des voies de signalisation de l'Ob-Rb médiées par le facteur STAT3 dans les cultures d'organoïdes issus de glandes mammaires de lapines nourries avec le régime témoin ou obésogène

Figure 27 : Utilisation des cellules HEK293T transfectées avec l'isoforme longue du récepteur de la leptine pour l'étude des voies de signalisation induites par cette cytokine

Figure 28 : Etude de l'activation des voies de signalisation de la leptine suite à l'addition de milieux conditionnés T et OB dans le milieu de culture de cellules HEK293T transfectées avec l'isoforme longue du récepteur de la leptine

Figure 29 : Courbe de croissance de la cohorte 1. A : souche FVB/N B : Souche C57BL/6

Figure 30 : Dosages sériques des triglycérides, cholestérol et glycémie à jeun dans les deux lignées de la cohorte 1 : FVB/N (A) et C57BL/6 (B)

Figure 31 : Nombre de petits vivants par portée à la naissance en fonction des lignées et des régimes pour les accouplements naturels (A) et pour les superovulations (B)

Figure 32 : Poids moyen des petits à la naissance

Figure 33 : Montages *in toto* représentatifs de glandes mammaires à 12 jours de gestation de souris de la cohorte 1

Figure 34 : Analyse histologique de glandes mammaires représentatives à mi-gestation des souris de la cohorte 1

Figure 35 : Expression des protéines du lait dans les glandes mammaires de souris de la cohorte 1 à mi-gestation

Figure 36 : Mesure de l'expression des transcrits codant la leptine

Figure 37 : Mesure de l'expression des transcrits codant les récepteurs de la leptine dans la glande mammaire par RT-PCRq

Figure 38 : Mesure du rapport d'expression des transcrits de la leptine et de son récepteur dans la glande mammaire

Figure 39 : Croissance des souris de la cohorte 2, de la naissance au sevrage, en fonction de l'effet *in utero* ou de l'alimentation maternelle

Figure 40 : Croissance des souris de la cohorte 2, de la naissance au sevrage, en fonction du lait ingéré

Figure 41 : Croissance des souris de la cohorte 2, à partir du sevrage, en fonction du lait ingéré

Figure 42 : Dosages sériques des triglycérides, cholestérol et glucose des deux lignées de la cohorte 2

Figure 43 : Montages *in toto* représentatifs de glandes mammaires à 12 jours de gestation de souris de la cohorte 2

INTRODUCTION

1. LA GLANDE MAMMAIRE

1.1. Développement, structure et fonction

La glande mammaire, caractéristique des mammifères, possède une structure anatomique unique permettant la synthèse du lait. Le lait maternel renferme tous les éléments nécessaires à la croissance du jeune et comporte des éléments immunologiques et hormonaux qui protègent et favorisent sa croissance. Le nombre de glandes mammaires est variable selon les espèces : une paire pectorale chez l'humain, 5 paires thoraco-inguinales chez la souris ou encore de 4 à 6 paires ventrales chez la lapine. La quantité de lait synthétisé est extrêmement variable en fonction des espèces et des individus.

1.1.1. Développement au cours de la vie

De manière arbitraire, on peut décrire le développement de la glande mammaire selon deux phases. Une première phase considérée comme hormono-indépendante qui a lieu avant la puberté et une seconde phase hormono-dépendante qui débute à partir de la puberté (Briskin & O'Malley 2010). Cette seconde phase est en partie cyclique puisque après chaque lactation la glande mammaire va subir une involution après le sevrage, avant un nouveau cycle de développement à la gestation suivante.

Le développement de la glande mammaire débute dès le stade fœtal où l'on distingue deux compartiments : le tissu épithélial et le tissu stromal environnant, qui dérivent respectivement de l'ectoderme et du mésoderme embryonnaires. Très tôt se forme la crête mammaire ou ligne lactéale. Le long de cette crête apparaissent par paires symétriques des épaissements ou bourgeons mammaires primitifs dont le nombre et la situation sont fonction de chaque espèce. Ils sont inguinaux chez les ruminants et les cétacés, abdominaux et multiples chez les carnivores et les rongeurs, pectoraux et au nombre de deux chez les primates. Ce nombre est en général double de celui des petits que la mère peut porter. Chez l'être humain unipare, la crête mammaire disparaît à 6 semaines et seuls persistent les deux bourgeons pectoraux. Puis, l'épithélium se développe en un nombre limité de canaux et à la naissance seule une arborescence canalaire rudimentaire est présente dans le stroma mammaire (Hovey *et al.* 2002).

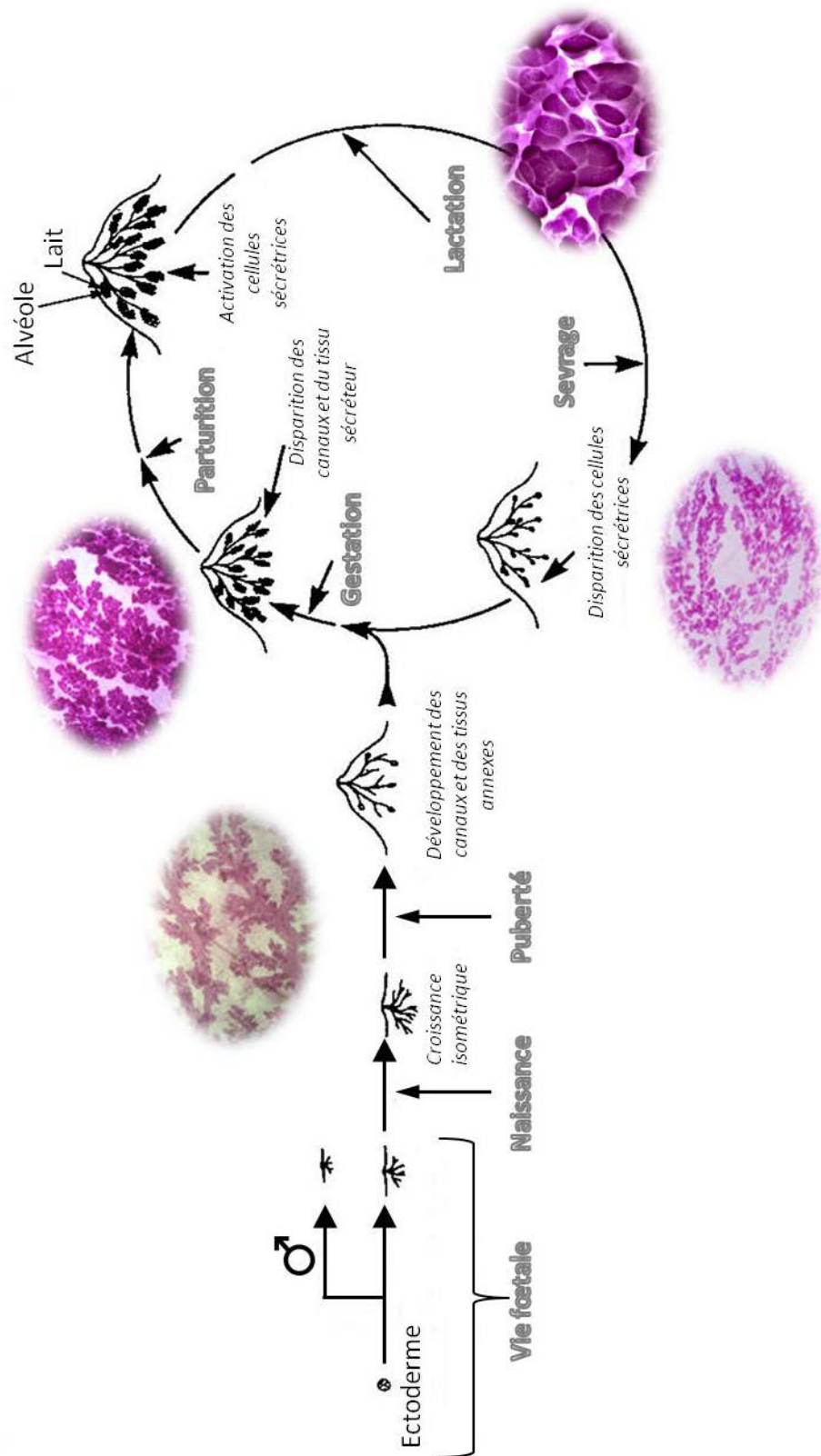


Figure 1 : Schéma général du développement mammaire, illustré par des montages *in toto* de glandes mammaires de lapine

(modifié d'après Martinet J., Biologie de la Lactation, Ed 2006)

La période allant de la naissance à la pré-puberté n'est pas une période de quiescence totale. La glande subit une évolution lente et régulière avec une croissance et une ramification des canaux galactophores en canaux de deuxième et troisième ordres, terminés par des structures spécifiques appelés bourgeons terminaux. La croissance est dite isométrique car l'organe grandit à la même vitesse que le reste de l'organisme. L'étape suivante du développement mammaire aura lieu à la puberté. La puberté intervient entre 4 et 6 semaines après la naissance chez la souris et entre 10 et 12 semaines chez la lapine. Les modifications observées pendant la puberté concernent principalement la croissance de l'épithélium mammaire et la ramification des canaux. Dans le cas du développement post-pubertaire de la glande mammaire, la croissance est allométrique, l'organe se développant plus rapidement que le reste de l'organisme.

Pendant la gestation, le compartiment épithélial s'étend et les acini bourgeonnent à partir des canaux. Le tissu conjonctif et la vascularisation du tissu adipeux se développent également (Briskin & O'Malley 2010). Pendant cette étape appelée « mammogénèse », on observe une augmentation du volume de la glande. Durant la seconde moitié de la gestation, les cellules épithéliales mammaires vont se multiplier et s'organiser en acini. Un réseau lobulo-alvéolaire dense se met alors en place, en lieu et place du tissu adipeux qui régresse (Neville *et al.* 1998).

L'étape suivante du développement mammaire est la lactogénèse, c'est-à-dire la différenciation des cellules épithéliales mammaires qui leur permet d'acquérir la capacité de synthèse et de sécrétion du lait. Les cellules vont se polariser et s'hypertrophier quelques jours avant la parturition, ce qui conduit à une activité sécrétoire intense.

Vient ensuite l'étape dite de galactopoïèse qui correspond à la période d'activité de synthèse et de sécrétion des composants du lait, par la glande mammaire pendant la lactation. Au début de la lactation, la mamelle produit du colostrum, dont l'aspect et la composition (Ig, protéines sériques, ...) sont très différents de celui du lait. Puis, après quelques jours, les jonctions intercellulaires se modifient, des jonctions serrées apparaissent, limitant le passage des protéines sériques dans le lait. La quantité de lait augmente durant les premières semaines, puis la lactation atteint son maximum pour décroître ensuite jusqu'au tarissement. L'intense activité sécrétoire des cellules épithéliales mammaires nécessite une irrigation sanguine considérable.

Les caractéristiques de la lactation sont variables suivant les espèces aussi bien par la durée de la période de lactation que par la fréquence de l'allaitement : une vingtaine de jours chez les rongeurs avec un allaitement quasi continu, un mois chez la lapine mais à raison d'une fois par jour et jusqu'à plusieurs années chez la femme selon différentes fréquences. La lactation s'interrompt lors du sevrage des petits avec la baisse progressive de la fréquence des tétées ou des traites chez les ruminants laitiers. L'accumulation du lait produit par la glande mammaire induit alors le processus d'involution, étape de remodelage de la glande mammaire qui va conduire à la régression du tissu alvéolaire par apoptose (Macias & Hinck 2012). Les adipocytes du stroma se développent et colonisent l'espace ainsi laissé par le tissu épithélial. A la fin de l'involution, la glande mammaire retrouve une morphologie proche de celle observée après la puberté et retourne dans un état de quiescence jusqu'à la gestation suivante, du moins chez les rongeurs car l'involution est moins marquée chez les bovins (Watson 2006).

1.1.2. Structure de la glande mammaire en lactation

La glande mammaire apparaît donc comme un tissu complexe composé de différents types cellulaires, entre autres, de cellules épithéliales, de cellules myoépithéliales, de cellules progénitrices et entourée d'adipocytes (Figure 2).

1.1.2.1. Les cellules épithéliales mammaires

Les cellules épithéliales mammaires (CEM) sont polarisées (Figure 3): leur pôle basal est situé du côté de la matrice extracellulaire et permet tous les échanges avec l'organisme via la circulation sanguine. Elles sont liées entre elles par des jonctions serrées et sont soutenues par une membrane basale constituée de laminine, de collagène et de glycosaminoglycanes. C'est au niveau de leur pôle basal que les CEM reçoivent les informations hormonales responsables de la stimulation de la synthèse du lait, grâce aux récepteurs qui sont présents au niveau de la membrane plasmique. Dans la partie basale de la cellule on retrouve également le noyau, ainsi que le réticulum endoplasmique rugueux.

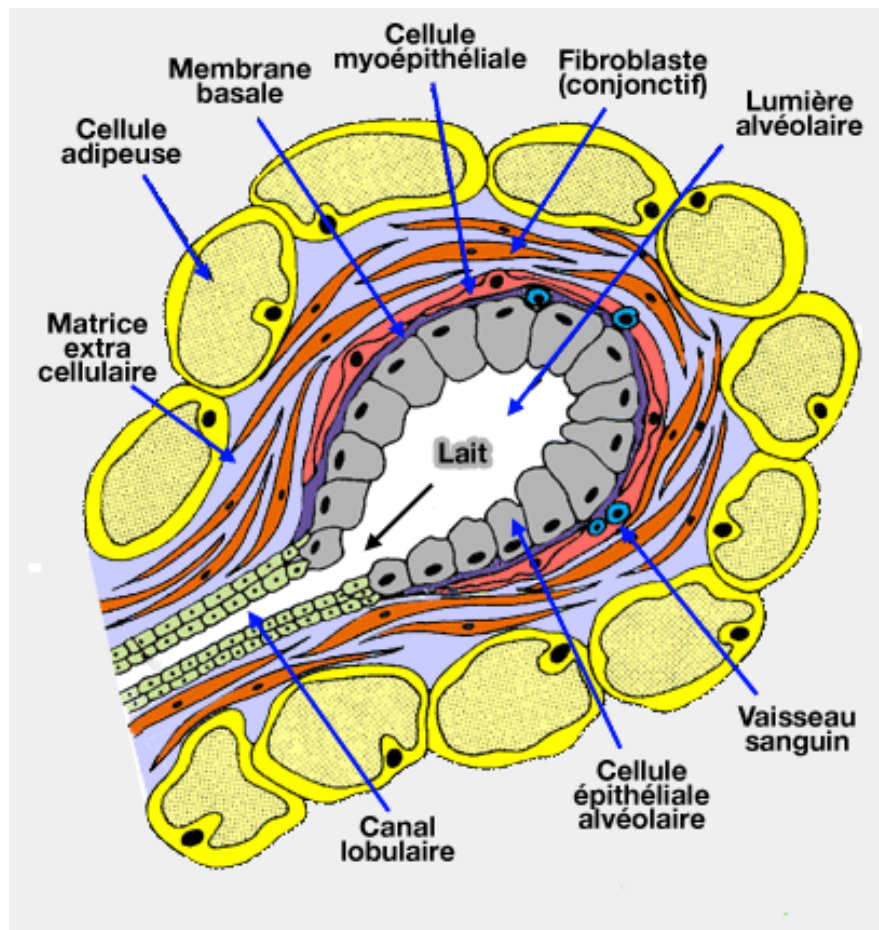
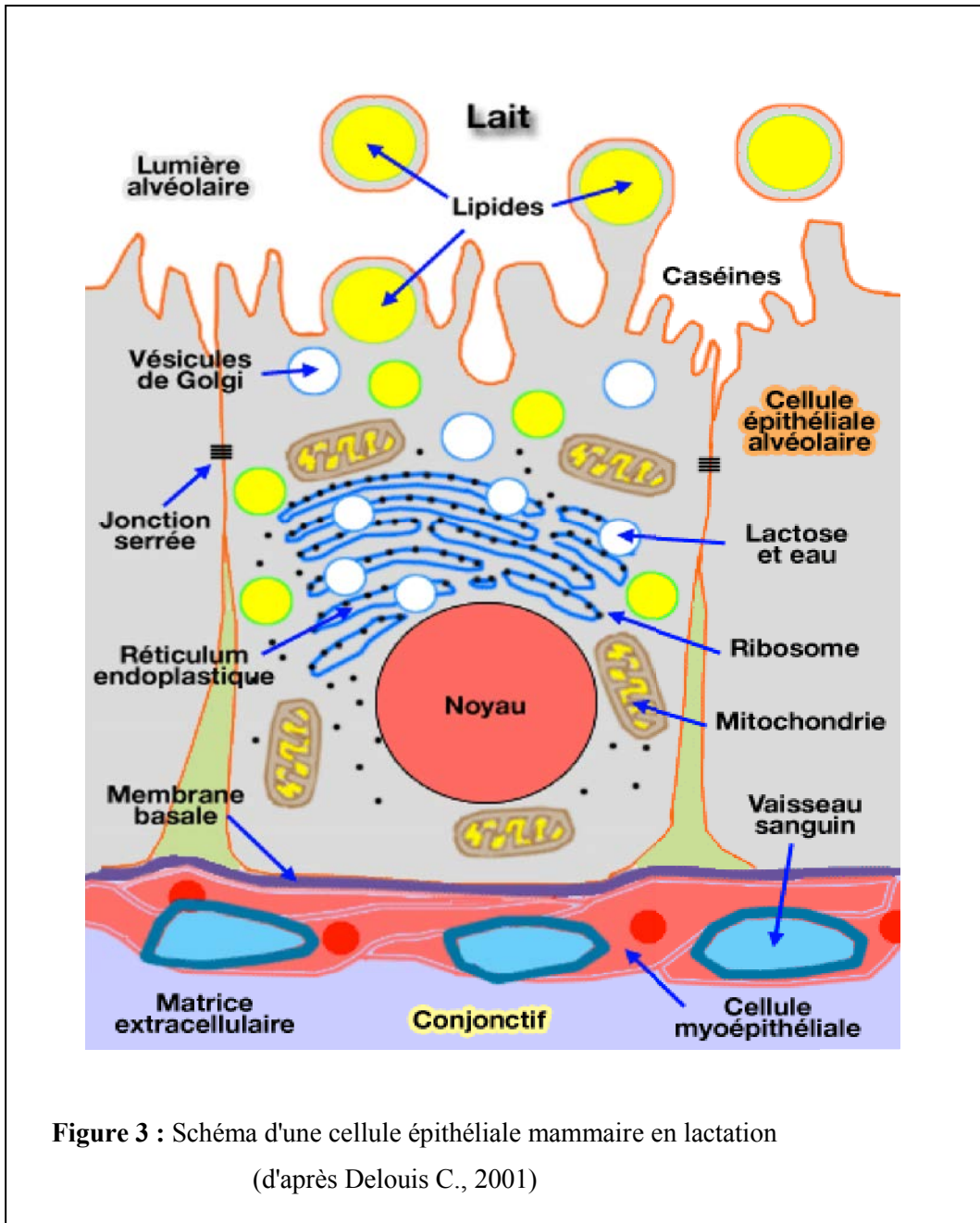


Figure 2 : Schéma d'un acinus mammaire
(modifié d'après Delouis C., 2001)

Le pôle apical ou luminal quant à lui, est situé du côté de la lumière alvéolaire, et constitue le lieu de sécrétion des composants du lait. Dans le cytoplasme, proche du pôle apical, se trouve l'appareil de Golgi ainsi que les gouttelettes lipidiques et les vésicules de sécrétion (Mather & Keenan 1998). La membrane plasmique apicale est composée de microvillosités, témoignant d'une forte activité sécrétoire. La synthèse des lipides du lait a lieu au niveau du réticulum endoplasmique où les gouttelettes se forment entre les deux couches lipidiques de la membrane, puis migrent vers le pôle apical de la CEM où elles vont s'entourer de membrane et bourgeonner avant d'être libérées dans la lumière sous forme de globules lipidiques. Les protéines du lait sont synthétisées par les ribosomes à la surface du réticulum endoplasmique, puis subissent leur maturation post-traductionnelle dans l'appareil de Golgi. Elles sont ensuite organisées en micelles, pour une majorité d'entre elles, avant d'être incluses dans des vésicules qui, en fusionnant avec la membrane apicale de la cellule, libèrent les micelles de

caséines dans la lumière des acini. Le lactose, quant à lui, est synthétisé au sein de l'appareil de Golgi et s'accumule dans les vésicules de sécrétion au niveau du pôle apical de la cellule (Mather & Keenan 1998).



Les cellules épithéliales mammaires sont regroupées entre elles pour former l'unité de production du lait appelée acinus ou alvéole (Figure 2). L'acinus est une structure de forme presque sphérique, dont la face interne est tapissée d'une monocouche de CEM et dont le

centre représente la lumière alvéolaire dans laquelle se déversent les constituants du lait. Des vaisseaux sanguins sont également en contact étroit avec les acini mammaires permettant ainsi à la fois l'approvisionnement des CEM en oxygène, nutriments et leur régulation par les hormones. Un groupe d'acini entouré de tissu conjonctif forme un lobule ; les lobules eux-mêmes sont regroupés en lobes et sont séparés du tissu adipeux environnant par du tissu conjonctif. Outre le tissu adipeux, la glande mammaire est formée d'une part, d'un ensemble de lobes connectés entre eux par des canaux galactophores qui débouchent au niveau du mamelon, constituant ainsi le parenchyme épithélial et, d'autre part, de tissu conjonctif fibreux et élastique constituant le stroma.

1.1.2.2. Les cellules myoépithéliales

Chaque acinus est entouré sur sa face externe de cellules myoépithéliales contractiles permettant l'éjection du lait vers les canaux. Ces cellules sont situées entre les cellules épithéliales et la membrane basale et correspondent à une variété très particulière de cellules musculaires lisses. Elles sont d'origine épithéliale comme l'indique leur nom et ensèrent les unités sécrétrices de glandes exocrines comme, par exemple, les glandes salivaires, mammaires ou sudoripares. Sous contrôle du système nerveux autonome, la contraction de ces cellules favorise une expulsion du produit de sécrétion, par exemple le lait dans le cas de la glande mammaire. Les cellules myoépithéliales sont souvent caractérisées par l'expression de l'actine du muscle lisse, ou celle du récepteur de l'ocytocine.

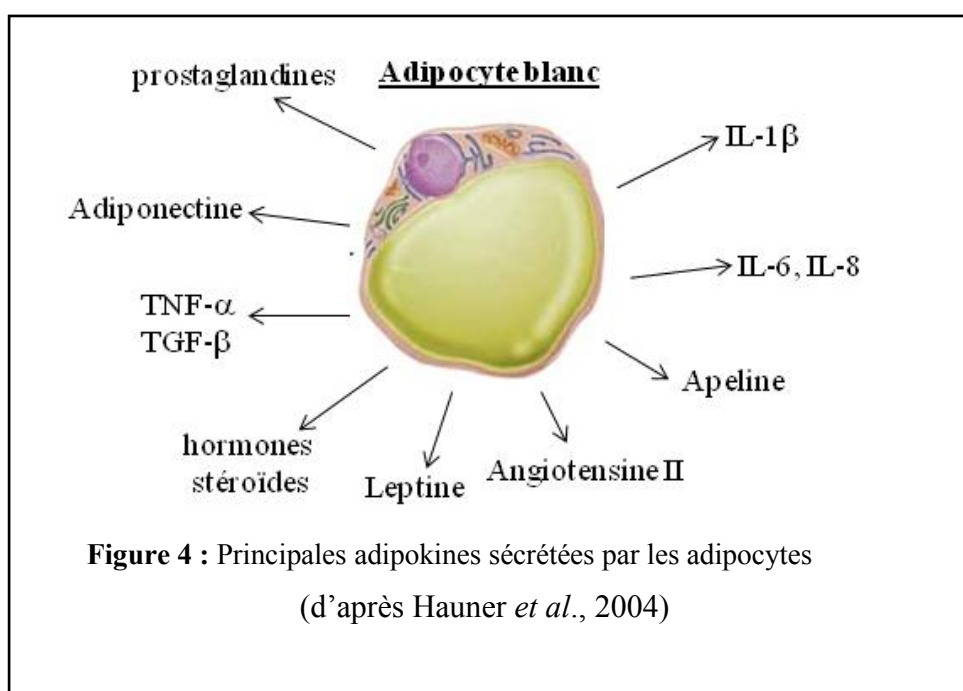
1.1.2.3. Les cellules progénitrices

En plus des différents types cellulaires décrits précédemment, la glande mammaire est également composée de cellules souches tissulaires adultes qui sont caractérisées par leur aptitude, à l'état isolé, à régénérer à long terme leur tissu d'origine dans sa structure et sa fonction. Ces cellules présentent une propriété fonctionnelle essentielle, l'auto-renouvellement qui est défini comme la capacité à engendrer au moins une cellule fille équivalente à la cellule mère aussi bien dans sa longévité que dans son aptitude à se différencier. Les cellules souches sont dites multipotentes lorsqu'elles donnent naissance aux

différents lignages de leur tissu d'origine, unipotentes, elles ne donnent naissance qu'à un lignage. Les capacités de développement et de régénération de la glande mammaire suggèrent que l'épithélium mammaire abrite des cellules souches. Des travaux de transplantation orthotopiques montrent que des fragments d'épithélium mammaires issus d'un individu adulte, peuvent reconstituer une arborescence complète une fois greffés dans les coussins adipeux dépourvus d'épithélium de souris pré-pubères par ablation des ébauches épithéliales (Deome *et al.* 1959). Ces mêmes techniques, répétées en série par transplantation secondaire du fragment d'épithélium néoformé, ont permis de démontrer les capacités régénératives à long terme de l'épithélium mammaire (Daniel *et al.* 2009). D'autres études effectuées chez la souris ont également montré que les cellules ayant un potentiel régénératif étaient présentes à tous les stades du développement et dans toutes les régions de la glande mammaire (Smith & Medina 1988). Enfin, des travaux récents ont montré que deux lignages mammaires ont pour origine des cellules embryonnaires souches et que l'homéostasie de la glande mammaire adulte pourrait être maintenue par deux types distincts de cellules progénitrices (Van Keymeulen *et al.* 2011).

1.1.2.4. Les adipocytes

Le tissu adipeux mammaire est très abondant et régresse au profit du tissu glandulaire lors de la gestation et surtout, la lactation. Il est formé d'adipocytes blancs, contenant un noyau, des mitochondries et une vacuole lipidique qui représente la majeure partie de la cellule.



En dehors de son rôle dans l'équilibre énergétique, la cellule adipeuse a progressivement acquis un statut de cellule endocrine. En effet, en 1994, le groupe de Friedman découvre que les adipocytes sécrètent la leptine (Zhang *et al.* 1994). Par la suite, de nombreuses études ont mis en évidence un très grand nombre de facteurs sécrétés par les adipocytes, regroupés sous le terme d'adipokines (Ronti *et al.* 2006).

1.1.3. Production et composition du lait

Le lait maternel est l'aliment qui répond le mieux aux besoins du jeune. Les caractéristiques de la composition du lait sont très variables car elles dépendent de nombreux facteurs inhérents au type de mammifère (espèce, race), à son état physiologique (stade de lactation, naissance à terme...) son état sanitaire et enfin à son alimentation. Malgré la variabilité et la multiplicité des facteurs influençant le volume et la qualité du lait maternel, il est possible de déterminer 2 types de lait distincts : le colostrum, épais jaune et peu abondant, déjà sécrété pendant la grossesse jusqu'aux tout premiers jours post-partum et le lait mature, blanc et plus abondant, sécrété par la suite.

La composition du lait fait l'objet de nombreuses études et de très nombreux composés ont pu être identifiés et caractérisés dans le lait maternel. On retrouve dans le lait, les classes majeures de composés, à savoir les carbohydrates, les protéines et les lipides. L'origine de ces nutriments est variable puisque ceux-ci peuvent être synthétisés *de novo* au niveau des CEM ou peuvent être apportés, *via* le sang, de l'alimentation ou des réserves maternelles.

Femelles	Matière grasse %	Protéines %	Lactose %	Matière sèche %
Vache (Holstein)	3.5	3.1	4.9	12.2
Chèvre	3.5	3.1	4.6	12
Femme	4.5	1.1	6.8	12.6
Lapine	12.2	10.4	1.8	26.4
Souris	29.8	12.7	1.7	45.5

Figure 5 : Comparaison de la composition du lait de différentes espèces de mammifères
(adapté de Jensen G *et al.*, 1995 et Görs S *et al.*, 2009)

Le sucre principal du lait est le lactose qui est un dioside composé de glucose et de galactose. Il est synthétisé dans l'appareil de Golgi puis transporté dans les mêmes vésicules que les caséines, avant d'être sécrété dans la lumière alvéolaire. Le lactose a un fort pouvoir osmotique, attirant l'eau et déterminant ainsi le contenu en eau du lait (Ball *et al.* 1988).

Les protéines du lait sont sous forme micellaire ou bien soluble. La phase micellaire comprend 80% des protéines totales du lait et en particulier les caséines, souvent notées α S1, α S2, β et κ , variables en nombre, en taille et en modifications post-traductionnelles. Ces protéines sont retrouvées dans le lait sous forme d'un complexe colloïdal formant une micelle, grâce à des liens assurés par les molécules de phosphate de calcium (Doppler *et al.* 1990). Les protéines solubles, aussi appelées protéines du lactosérum, représentent les 20% restants des protéines totales. Ces protéines sont celles qu'on retrouve dans le lait après avoir enlevé les globules gras et précipité les micelles de caséines. Elles sont majoritairement représentées par l' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline, l'albumine, la protéine acide du lactosérum (Whey Acidic Protein ou WAP, présente chez les rongeurs, les lagomorphes et les chameaux), la transferrine, la lactoferrine et diverses immunoglobulines en quantités variables selon les espèces. Le lait contient également de nombreuses hormones et enzymes d'origine maternelle.

Les lipides sont présents dans le lait sous forme de globules gras constituée de 98,5% de glycérides (esters d'acides gras et de glycérol), 1% de phospholipides et 0,5% de substances liposolubles (cholestérol, vitamines,...). Les globules gras vont fusionner dans le cytoplasme des CEM pour former des structures de plus en plus grosses, qui seront sécrétées dans les lumières alvéolaires. Tout comme les protéines, la composition du lait en lipides est très variable d'une espèce à l'autre. Les acides gras (AG) du lait diffèrent par la longueur de leur chaîne carbonée, le nombre de double liaisons et la position de celles-ci. Ils peuvent être synthétisés par les cellules mammaires ou être apportés par voie sanguine lorsqu'ils sont issus de l'alimentation ou de la lipolyse des réserves maternelles. On note cependant que les AG contenant plus de 16 atomes de carbones viennent de la circulation sanguine puisque les cellules épithéliales mammaires ne possèdent pas d'élongase, enzyme indispensable à la synthèse de ce type de lipides (Debnath *et al.* 2003).

L'étude de la composition du lait revêt une importance capitale dans la mesure où de nombreux travaux démontrent le rôle de cette composition, allié à l'alimentation *in utero*, dans le modelage des goûts et des perceptions sensorielles du jeune (Stingl *et al.* 2006).

1.2. Contrôle hormonal du développement mammaire

La glande mammaire se développe selon des cycles plus ou moins longs selon les espèces. Ce développement peut dépendre des cycles oestriens, qui correspondent à la succession des événements entre deux ovulations en absence de fécondation. Il peut être plus ou moins altéré lors de processus tels que la superovulation ou encore la pseudogestation, mais c'est seulement après la fécondation que la glande mammaire poursuivra son cycle de développement le plus important incluant alors la lactation et l'involution.

1.2.1. Principales hormones et facteurs de croissance

La régulation du développement de la glande mammaire est majoritairement liée à l'action des hormones ovariennes telles que les œstrogènes et la progestérone, mais également à celle d'autres hormones comme la prolactine (PRL), les glucocorticoïdes, mais aussi l'hormone de croissance, l'hormone lactogène placentaire ou l'ocytocine. Ces hormones vont intervenir de manière séquentielle ou simultanée comme illustré dans la figure 6.

Les œstrogènes : Sécrétés essentiellement par les ovaires sous l'effet de la LH, ils agissent sur leurs tissus cibles par l'intermédiaire de deux types de récepteurs nucléaires, ER α et ER β . Les effets des œstrogènes sur le développement mammaire sont essentiellement médiés par l'ER α . Lors des premiers cycles menstruels, sous l'influence de la sécrétion des œstrogènes ovariens, la glande mammaire se développe : la prolifération des canaux s'accompagne d'un important développement du tissu conjonctif interlobaire et interlobulaire ainsi que d'une multiplication des cellules adipeuses (Briskin & O'Malley 2010).

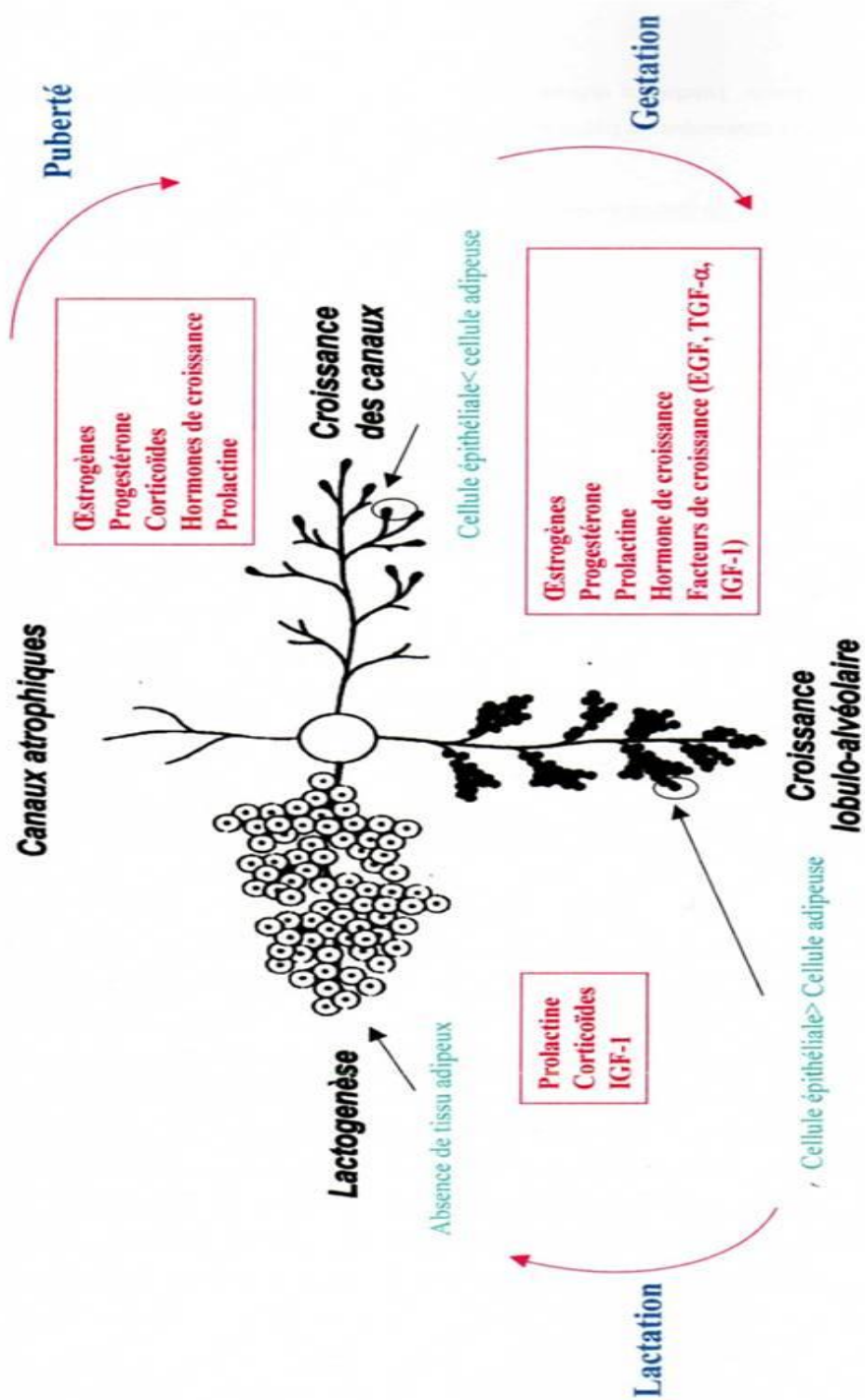


Figure 6 : Représentation schématique des hormones impliquées dans le développement de la glande mammaire

(d'après Laud K., 1999)

La progestérone : Sécrétée principalement par le corps jaune des ovaires et par le placenta chez certaines espèces durant la gestation, elle participe à la formation de l'arborescence mammaire durant la puberté, puis de manière intensive lors de la gestation, au développement des acini (Briskin *et al.* 1998). En effet, l'inactivation des récepteurs de la progestérone (PR-A et PR-B), chez la souris, perturbe le développement alvéolaire. Cependant seul PR-B est nécessaire à l'action proliférative de la progestérone sur les CEM (Mulac-Jericevic *et al.* 2003). Il existe un dialogue fort entre les hormones stéroïdes comme en témoigne la capacité des œstrogènes à induire l'expression des récepteurs de la progestérone (Haslam 1988). Par ailleurs, l'association œstrogènes-progestérone est inhibitrice de la lactogénèse provoquée par la PRL chez la lapine ovariectomisée (Delouis *et al.* 2001), suggérant ainsi une intervention directe des hormones ovariennes sur les mécanismes mis en jeu par la PRL pour orienter l'activité de la cellule épithéliale mammaire vers la sécrétion.

L'hormone de croissance (GH) : Sécrétée par la partie antérieure de l'hypophyse, cette hormone stimule la croissance et la multiplication cellulaire. Lors de la puberté, la GH active son récepteur localisé dans le stroma mammaire, entraînant une production d'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), qui stimule localement la prolifération des CEM (Kelly PA 2002).

L'hormone lactogène placentaire (PL) : Cette hormone de la gestation, synthétisée par la partie fœtale du placenta, possède des activités mimétiques de la GH et de PRL. Au niveau de la CEM, elle se fixe sur des récepteurs membranaires composés d'hétérodimères de récepteurs GH et PRL (Helman *et al.* 2001). Les fonctions de cette hormone sont dépendantes de la quantité synthétisée par le placenta, qui diffère selon les espèces. En particulier, elle est produite par le placenta des ruminants, des rongeurs et des humains, ce qui n'est pas le cas chez les lapins (Servely *et al.* 1983).

La prolactine : Sécrétée par l'hypophyse, elle joue deux rôles essentiels au cours de la reproduction : le maintien du corps jaune dans l'ovaire en début de gestation assurant ainsi la production d'œstrogènes et de progestérone et une action sur les CEM durant la gestation tardive. Les souris chez lesquelles les gènes codant la PRL ou son récepteur ont été invalidés présentent des phénotypes similaires avec une absence d'acini mammaires fonctionnels (Ormandy CJ 1997). La prolactine participe également à l'induction de l'expression de protéines du lait telles que la WAP ou les caséines (Ibarra *et al.* 2007; Eirew *et al.* 2008).

Les glucocorticoïdes : Dans la majorité des espèces étudiées, les glucocorticoïdes, synthétisés par les glandes surrénales, exercent un effet amplificateur des actions de la PRL sur la glande mammaire (Devinoy & Houdebine 1977). Ils agissent d'une part, au niveau de la stabilité des ARN messagers et, d'autre part, au niveau de la transcription des gènes des protéines du lait (β -caséine) en se fixant à des séquences spécifiques de l'ADN (apparentées à des « glucocorticoid responsive element ») et/ou en interagissant avec d'autres facteurs de transcription tels que STAT5 (Sheffield 1998; Brennan *et al.* 2008). *In vivo*, des injections de glucocorticoïdes associées à un traitement oestro-progestatif d'induction de lactation permettent d'augmenter la production laitière chez la brebis (Head *et al.* 1980).

L'ocytocine : Synthétisée et sécrétée au niveau du système hypothalamo-hypophysaire, cette hormone agit au niveau mammaire en réponse au stimulus de succion du jeune, et permet d'induire la contraction des cellules myoépithéliales et d'expulser le lait produit par les acini vers les canaux galactophores puis le mamelon (Lollivier *et al.* 2006).

Au-delà de l'action directe ou indirecte de ces hormones sur le développement mammaire, d'autres molécules jouent également un rôle primordial sur ce processus. En effet, la CEM est capable de synthétiser des facteurs aussi bien stimulateurs qu'inhibiteurs de sa propre croissance et/ou différenciation. Parmi ces facteurs on peut citer le Transforming Growth Factor alpha (TGF- α) ou l'Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) qui favorisent le développement mammaire (Dehnhard *et al.* 2000), le TGF- β qui inhibe le développement des canaux galactophores (Kordon EC, 1995) ou encore l'Epidermal Growth Factor (EGF) dont les effets stimulants ont lieu pendant la lactation (Dehnhard *et al.* 2000).

1.2.2. Cas particuliers de la superovulation et de la pseudogestation

La superovulation est une modification globale du tractus génital, qui induit une production accrue d'ovocytes chez une femelle. Elle peut être notamment provoquée par des injections consécutives de fortes doses d'œstrogènes et de progestérone (Brayton *et al.* 2001). Les effets à court terme de ces deux hormones sur le développement mammaire ont été moins étudiés ; cependant des études sur des modèles ovins, ont montré des effets importants, à plus long terme sur la production laitière. Ces effets ont été imputés d'une part, à l'augmentation du

nombre de cellules mammaires sécrétrices et, d'autre part, à une augmentation de l'activité de celles-ci durant la gestation (Manalu *et al.* 2000).

La pseudogestation quant à elle, est définie par un ensemble de paramètres caractéristiques de la gestation (modifications comportementales, hormonales, physiques et organiques) qui apparaissent en absence de fécondation. Ce phénomène a lieu chez de nombreuses d'espèces, parmi lesquelles on retrouve les espèces modèles que sont les rongeurs et les lagomorphes. Plusieurs situations peuvent y aboutir :

- Un coït non fécondant (trop précoce ou trop tardif par rapport à l'ovulation, ou avec un mâle stérile ou vasectomisé). Certaines études ont montré que chez certaines souches de souris 15% des coïts étaient stériles et conduisaient à des pseudogestations.
- La stimulation mécanique ou électrique du vagin ou du col utérin, par exemple lors de la réalisation d'un frottis vaginal.
- Parfois, des pseudogestations spontanées se produisent dans des groupes de femelles cohabitant ensemble.

La pseudogestation se caractérise par la persistance d'une concentration sérique de progestérone élevée, due à la présence d'un corps jaune sur les ovaires. Ces corps jaunes ont une durée de vie plus importante qu'un corps jaune cyclique et peuvent parfois persister aussi longtemps qu'un corps jaune de gestation (Hvid *et al.* 2012). En élevage, l'accouplement non fécondant induisant une pseudogestation est utilisé pour préparer le tractus génital de la femelle afin de réaliser des inséminations artificielles et des transferts d'embryons. Ainsi, les chances de réussite de l'implantation des embryons augmentent.

1.2.2.1. La pseudogestation chez la souris

Chez la souris et la ratte, la stimulation vaginale est responsable de la sécrétion de deux pics de PRL (un diurne et un nocturne) qui transforment le corps jaune en une unité active sécrétant de la progestérone. L'augmentation de la progestérone entretient à son tour la sécrétion quotidienne de PRL. Ces événements sont identiques lors d'une gestation. La différence tient au fait que pendant la pseudogestation, les mécanismes de lutéolyse se mettent en place vers le 10^{ème} jour post-coïtum rendant le corps jaune non sécrétant. En absence de placenta susceptible de prendre le relai de la sécrétion de progestérone, le cycle de développement de la glande mammaire est alors interrompu. Ainsi, chez la souris, la

pseudogestation s'étend sur une période de 10 à 13 jours, délai qui correspond à la durée de sécrétion active de progestérone par le corps jaune.

La prolifération des CEM est augmentée chez les femelles pseudogestantes tout comme chez les femelles ayant reçu une combinaison d'œstrogènes et de progestérone destinée à provoquer une superovulation (Brayton *et al.* 2001).

La pseudogestation chez les rongeurs est médiée par des mécanismes différents de ceux observés chez les espèces à ovulation provoquée, comme la lapine et la chatte. Chez ces dernières, la stimulation vaginale provoque l'ovulation et le maintien du corps jaune, appelé alors corps jaune secondaire.

1.2.2.2. La pseudogestation chez la lapine

Contrairement à la majorité des mammifères, la lapine ne présente pas de cycles oestriens avec apparition régulière de périodes d'œstrus au cours desquelles l'ovulation a lieu spontanément. Elle est considérée comme une femelle en œstrus permanent et l'ovulation ne se produit que s'il y a accouplement. Lorsqu'un nombre suffisant de follicules matures est présent sur l'ovaire, le taux circulant des œstrogènes est élevé. Cette information est intégrée par le système nerveux central qui modifie le comportement sexuel de la lapine et si ce taux est suffisamment élevé, la lapine devient réceptive à l'accouplement. Compte tenu de la variabilité entre individus, ce taux "suffisant" varie beaucoup d'une lapine à l'autre (d'après La biologie du lapin de F. Lebas <http://www.cuniculture.info/Docs/indexbiol.htm>). L'ovulation est induite par les stimuli associés au coït. Elle a lieu 10 à 12 heures après la saillie. Dans la minute suivant l'accouplement, le taux d'ocytocine s'accroît tandis que celui de la PRL décroît.

Lorsque les ovocytes libérés ne sont pas fécondés, il se produit une pseudogestation qui dure 15 à 18 jours. Pendant les premiers jours, le développement des corps jaunes et l'évolution de l'utérus sont les mêmes que dans le cas d'une gestation ; toutefois, les corps jaunes n'atteignent ni la taille, ni le niveau de production de progestérone des corps jaunes de gestation. Pendant toute cette période, la lapine refuse l'accouplement contrairement à ce qui est observé durant la gestation. En effet, chez la plupart des mammifères, la progestérone sécrétée durant la gestation inhibe totalement l'œstrus et la femelle en gestation refuse

l'accouplement. A l'inverse, la lapine gestante peut accepter l'accouplement tout au long de la gestation. Vers le 12ème jour post-coïtum, les corps jaunes commencent à régresser puis disparaissent. La fin de la pseudogestation est accompagnée de l'apparition d'un comportement maternel (construction d'un nid) liée à l'abaissement rapide du taux de progestérone sanguin. Le développement de la glande mammaire chez la lapine en pseudogestation est très similaire à celui observée durant la première moitié de la gestation, rendant ainsi possible l'utilisation du tissu mammaire pseudogestant à des fins expérimentales pour des études *ex vivo* (Strong *et al.* 1972).

1.3. Les spécificités de la glande mammaire de lapine

Chez la lapine, deux rangées de 4 à 5 et exceptionnellement 6 mamelles sont situées sur la face ventrale du corps. Le nombre de mamelles fonctionnelles peut ne pas être réparti de façon symétrique et présenter un nombre pair (8 ou 10 tétines) ou impair (9 ou beaucoup plus rarement 11 tétines). A chaque tétine, reliée à 5-6 canaux évacuateurs, correspond une glande mammaire séparée. Le tissu mammaire est disposé entre la peau et les muscles pectoraux auxquels il est attaché par du tissu conjonctif.

La durée de gestation de la lapine, de 28 à 32 jours, varie en fonction des races, des individus et des conditions environnementales. La croissance de la glande mammaire est importante pendant la première moitié de la gestation. On note alors la présence d'un important développement lobulo-alvéolaire ainsi qu'une forte augmentation du contenu en ADN. Un développement similaire a également été décrit dans le cas de glande mammaire de lapine à 16 jours de pseudogestation. A partir de ce stade, correspondant à la mi-gestation, la glande mammaire est apte à être stimulée par les hormones lactogènes afin de synthétiser les composants du lait (Lu & Anderson 1973). Une très forte augmentation du taux de protéines synthétisées par la glande mammaire a été observée chez la lapine entre la fin de la gestation et la lactation (Denamur 1963b).

Comme chez d'autres espèces, la lactogénèse est sous la dépendance de la PRL. Pendant la gestation, elle est inhibée par les œstrogènes et la progestérone. A la parturition, une diminution rapide de la teneur en progestérone peut être observée, ainsi qu'une libération d'ocytocine. La prolactine peut ainsi exercer son action permettant la montée laiteuse dans une

glande dont le développement se poursuit en début de lactation (Denamur 1963a). Chez la lapine, 67% de la croissance mammaire a lieu pendant la gestation et 33% pendant la lactation (Denamur 1963b). De cette manière, au moment de la mise bas, il y a déjà 50 à 80 g de lait dans les mamelles de la lapine. Ce type de lait est appelé colostrum. Il est consommé par les lapereaux au fur et à mesure des naissances : les premiers nés ont clairement fini de téter quand "sortent" les derniers lapereaux de la portée malgré la rapidité de la mise bas (10 - 20 mn) (Challis *et al.* 1973). Lorsque la lapine allaite sa portée, les stimuli créés par la tétée provoquent la sécrétion immédiate d'ocytocine, la pression intra-mammaire augmente, l'éjection du lait se produit et les lapereaux vident presque totalement la mamelle (80 à 90% du lait présent). Le taux d'ocytocine ne reste élevé que 3 à 5 minutes. La durée totale de la tétée (entrée-sortie de la boîte à nid) n'est d'ailleurs que de 2 à 4 minutes et n'a lieu qu'une fois toutes les 24 heures. La concentration plasmatique d'ocytocine s'accroît de 40 pg/ml de plasma 2 jours après la mise bas, à 250 et 490 pg/ml au milieu puis en fin de lactation, sachant qu'un taux minimum de 20-25 pg/ml est nécessaire à l'enclenchement du processus d'éjection du lait. A l'inverse, la durée de la tétée décroît lentement mais régulièrement avec l'avancée de la lactation, passant de 200 à 150 secondes par exemple entre les 14^{ème} et 35^{ème} jours d'allaitement. Enfin cette durée est indépendante du nombre de lapereaux allaités et du fait qu'une lapine soit ou non simultanément gestante (Calvert *et al.* 1985). La production quotidienne de lait croît de 30-50 g les deux premiers jours à 200-250 g vers la fin de la 3ème semaine de lactation, voire 300 g/jour pour les souches les plus laitières. Ensuite elle décroît rapidement (Maertens 2006).

Comparé aux laits de vache, de chèvre ou de brebis, le lait de lapine est beaucoup plus concentré, à l'exception du lactose (Figure 5). A partir de la 4ème semaine de lactation, le lait s'enrichit sensiblement en protéines et surtout en lipides. En revanche, sa teneur en lactose, déjà faible, diminue encore pour devenir quasi nulle au-delà du 30ème jour de lactation. Les matières grasses du lait sont composées principalement de triglycérides, mais contiennent de faibles quantités d'acides gras libres, de phospholipides et de cholestérol. La teneur en acides gras du lait varie en fonction de la nature du régime alimentaire, de la souche considérée et de l'origine des animaux.

1.4. Les spécificités de la glande mammaire de la souris

La souris possède cinq paires de glandes mammaires, situées au niveau ventral entre la peau et le péritoine : une paire de glandes cervicales, deux paires de glandes thoraciques, une paire de glandes abdominales et une paire de glandes inguinales.

Chez la souris, comme chez la plupart des mammifères, le développement mammaire est en relation avec les cycles de reproduction. L'ovulation a lieu à intervalles réguliers au cours de la période des chaleurs, ou œstrus. L'intervalle entre deux périodes d'œstrus représente la durée du cycle ovarien qui est de 3 jours, la durée de gestation est de 21 jours. La croissance de la glande mammaire de souris peut être estimée par la mesure du contenu en acides nucléiques. Ce contenu a été évalué à 78% de l'ADN total synthétisé durant la gestation et 22% pendant la lactation (Denamur 1963b). Suivant les souches, les femelles peuvent allaiter 6 à 12 petits par portée sur une période de lactation de 21 jours dont le maximum de production se situe au 10ème jour. Les petits tètent de manière quasi-continue un lait dont la composition varie en fonction de la souche de souris et du stade de lactation.

1.5. Modèles permettant l'étude de la glande mammaire

Parce que le développement mammaire a lieu essentiellement pendant la période post-natale et parce que ce tissu est aisé à manipuler, la glande mammaire est un modèle de choix pour :

- étudier les mécanismes sous-jacents à la formation des structures épithéliales tubulaires, et leur capacité à créer un réseau de branchements ;
- examiner la formation de structures alvéolaires multicellulaires simples et l'établissement de leur polarité ;
- étudier les voies de signalisation intracellulaires, la transcription et l'influence du type de matrice sur ces voies ;
- comprendre les voies de signalisation hormonales et leur régulation (Mroue & Bissell 2013)

Un grand nombre de techniques sont actuellement utilisées afin de déterminer les éléments de régulation et de signalisation qui contrôlent le phénotype mammaire : cela inclut des approches *in vivo* telle que la transgénèse, ou des méthodes *ex vivo* de reconstruction tissulaires, la culture organotypique. Cependant pour une analyse plus fine de la fonction

moléculaire, il est souvent nécessaire de simplifier un système multicellulaire complexe en se plaçant au niveau de la cellule individuelle. Les cultures cellulaires permettent en particulier l'analyse approfondie des mécanismes d'action des hormones à travers l'étude de leurs récepteurs, ainsi que des voies de transduction utilisées par les différents messagers cellulaires.

Par ailleurs, il convient actuellement d'organiser la recherche animale dans le respect de la règle des « 3R » : «Réduction, Raffinement, Remplacement». Réduction consiste à essayer de minimiser le nombre d'animaux utilisés, Raffinement correspond à la diminution de la souffrance animale et Remplacement consiste à remplacer tant que faire se peut l'animal par une méthode alternative. La culture de cellules épithéliales semble donc être particulièrement appropriée pour répondre à ce type d'arguments dans le contexte d'un projet scientifique concernant la glande mammaire. Bien qu'elle ne soit pas une fin en soi, elle constitue un outil indispensable à la biologie cellulaire chez les eucaryotes supérieurs. En effet, la culture cellulaire permet de faire vivre *in vitro* des cellules, de natures et d'origines variées, d'en modifier les propriétés ou d'augmenter leur nombre, afin d'en disposer en grande quantité. Il est alors nécessaire d'obtenir et de caractériser le type de cellules vivantes cultivées, de trouver un moyen de les faire survivre dans les conditions artificielles du laboratoire, au mieux de les faire proliférer, tout en maintenant des conditions acceptables de stress. Les conditions de culture et les propriétés du milieu sont pour cela capitales.

1.5.1. Les lignées mammaires immortalisées

Plusieurs lignées de cellules mammaires différenciées spontanément immortalisées ont été décrites.

Les cellules Comma-1D, obtenues à partir de glande mammaire de souris, prélevée à mi-gestation, se différencie sous l'influence des hormones en présence de collagène I (Medina *et al.* 1986). Plusieurs clones stables ont pu être isolés à partir de ces cellules. L'un d'eux, le clone HC11, est capable de synthétiser des caséines en quantité relativement abondante en présence d'insuline, de glucocorticoïdes et de PRL, mais à condition d'être maintenu à l'état d'hyper confluence pendant la phase d'induction (Ball *et al.* 1988; Doppler *et al.* 1990). D'autres lignées existent et sont un atout important pour l'étude des mécanismes de régulation

hormonale à l'origine de la synthèse et/ou la sécrétion des composants du lait (Skaar & Baumrucker 1993).

Des cellules épithéliales mammaires bovines (BME) ont également été isolées. Ces cellules conservent sur collagène certaines caractéristiques de CEM en lactation, dont la capacité à synthétiser des caséines (Gibson *et al.*, 1991). D'autres lignées bovines peuvent s'organiser en mammosphères sur des matrices extracellulaires complexes, allant même jusqu'à former des structures de type canalaire (German & Barash 2002), même si leur capacité à synthétiser et sécréter les protéines du lait reste très limitée (German & Barash, 2002).

Une lignée a été dérivée à partir de cellules mammaires de brebis à mi-gestation. Ces cellules forment des structures *in vitro* qui ressemblent à celles des canaux et des acini mais peuvent seulement sécréter de la β -lactoglobuline une fois cultivées en présence de matrices extracellulaires adaptées (Ilan *et al.* 1998).

Parmi les nombreuses lignées mammaires isolées à partir de biopsies de sein chez la femme, la lignée MCF10, non tumorale, constitue un outil de choix pour étudier la formation de structures mammaires polarisées, ressemblant à des acini et possédant plusieurs aspects des structures glandulaires retrouvées *in vivo* (Pauley *et al.* 1993; Debnath *et al.* 2003). Un certain nombre de lignées tumorales mammaires a également été établi (MCF7, T47D, HBL100, ...). Cependant aucune de ces lignées n'a gardé une capacité significative à synthétiser les composants du lait, probablement parce que dérivant de tumeurs relativement évoluées, elles ont perdu leur capacité à se différencier (Ginsburg & Vonderhaar 1995).

1.5.2. Les cellules souches mammaires

Les lignées cellulaires établies à partir de glandes mammaires ne peuvent cependant pas reproduire entièrement le processus de différenciation, probablement parce qu'elles sont déjà elles-mêmes engagées dans un processus de différenciation spécifique.

La glande mammaire possède des cellules souches tissulaires adultes qui sont caractérisées par leur aptitude à régénérer leur tissu d'origine, dans sa structure et sa fonction, à long terme et à l'état isolé (Stingl *et al.* 2006; Ibarra *et al.* 2007; Eirew *et al.* 2008). Ces cellules ont

montré leur capacité à reconstituer une arborescence mammaire une fois transplantées (Daniel *et al.* 2009).

Des essais de transplantations dans le coussin adipeux d'une souris prépubère, de populations cellulaires purifiées, ont montré que des cellules non mammaires, par exemple de type testiculaire, peuvent répondre aux signaux paracrines mammaires et ainsi subir une reprogrammation, leur permettant de participer à la croissance et la différenciation de la glande mammaire (Boulanger *et al.* 2013; Bruno *et al.* 2014). Ces travaux ont permis d'amener un éclairage nouveau concernant le développement mammaire et les interactions entre les divers types cellulaires qui composent le tissu. Toutefois, de nombreuses questions restent à approfondir et nécessitent d'isoler les organoïdes ou les cellules individuelles afin de créer des modèles *ex vivo*.

1.5.3. La culture primaire des cellules épithéliales mammaires

Des cellules épithéliales peuvent être isolées à partir de glande mammaire à tous les stades : en pseudogestation, mais plus souvent en gestation ou encore en lactation. Ces cellules en culture peuvent être utilisées dans la mesure où on peut y induire une morphogenèse, une différenciation ou une apoptose, mimant ainsi les événements analogues à ceux observés *in vivo*.

Les mécanismes moléculaires par lesquels les processus de prolifération, différenciation ou apoptose interviennent peuvent être caractérisés en utilisant le modèle de culture primaire de CEM : on peut citer par exemple l'établissement de cultures primaires où les organoïdes mammaires s'attachent à une matrice que les cellules vont coloniser. Cependant, ôter des cellules issues de glande mammaire en gestation de leur milieu naturel où elles sont en contact avec une membrane basale pour les mettre sur un support artificiel, peut engendrer la mort cellulaire en l'absence de signaux de survie délivrés par la matrice extracellulaire (Pullan *et al.* 1996). En effet, les cellules épithéliales mammaires requièrent un environnement bien particulier pour survivre, proliférer et sécréter les composants du lait. La matrice extracellulaire fournit des signaux moléculaires soit pour inhiber l'apoptose des cellules, soit pour induire la différenciation des cellules et la transcription tissu-spécifique des gènes des protéines du lait (Howlett & Bissell 1993). Le contact entre les cellules est également

important dans la différenciation, incluant l'établissement de la polarité et la direction de la sécrétion des produits du lait du pôle basal vers l'apex (Parry *et al.* 1987). Enfin, de nombreux travaux ont montré que les CEM isolées de leur contexte tissulaire et cultivées sur support plastique perdaient très rapidement leur sensibilité aux hormones. En revanche, ces mêmes cellules cultivées à confluence sur un gel de collagène I ou sur des matrices extracellulaires plus complexes, comme celles extraites de tumeurs, retrouvent leur capacité à synthétiser des composants du lait en réponse aux hormones (Jolivet *et al.* 2005). De la même manière, des cellules épithéliales mammaires isolées à partir de glande mammaire de souris vierge peuvent se diviser dans un gel de collagène et ensuite se différencier sous l'influence des hormones lactogènes.

Ainsi, les cellules mammaires subissent des modifications morphologiques et fonctionnelles suivant le type de support sur lequel elles sont étalées (Streuli & Bissell 1990). Lorsque ce support est une fine couche de collagène ou des matrices extracellulaires issues de tumeurs, les cellules subissent des réarrangements morphologiques, formant des structures de type « cavités sphériques » au lieu de tapis monocellulaires. Cultivées en absence d'hormones lactogènes et en présence d'une matrice extracellulaire, les CEM primaires s'agrègent pour former des sphères pleines ressemblant aux acini. Des modèles de reconstruction tridimensionnelle de structures mammaires fonctionnelles font actuellement l'objet de nombreux travaux destinés à étudier le développement mammaire normal et tumoral (Vidi *et al.* 2013). Les cellules qui sont en contact direct avec la matrice vont se différencier et se polariser, tandis que celles qui sont au centre disparaissent par apoptose (Howlett & Bissell 1993). Si la matrice extracellulaire est ôtée, les cellules deviennent tumorales.

Au lieu de reconstituer le tissu mammaire à partir de ces constituants, il est possible de cultiver, pendant plusieurs jours dans des milieux de culture ne contenant pas de sérum, des fragments de glande mammaire, prélevées chez des femelles gestantes. Dans ces conditions, le tissu mammaire étant partiellement développé, l'induction de la synthèse des constituants du lait par les hormones peut se faire indépendamment de la multiplication cellulaire. Il a ainsi pu être démontré qu'une association d'insuline à haute concentration, de glucocorticoïdes et de PRL à concentration physiologique était nécessaire et suffisante pour induire une synthèse de caséines. Il semble qu'il y ait une forte corrélation entre le niveau d'ARNm et le taux de synthèse de la protéine correspondante, ce qui suggère que la quantité d'ARNm est le facteur limitant *in vitro* et que le mécanisme de contrôle de la traduction de

ces ARNm ne s'exerce pas ou peu dans ces conditions de culture (Hobbs *et al.* 1982). Dans le meilleur des cas, le taux de synthèse des protéines du lait obtenu *in vitro* ne dépasse pas 10% de celui observé chez l'animal allaitant. Ainsi la régulation hormonale observée *in vivo* peut être reproduite *in vitro* avec des explants mammaires dans des conditions de culture bien définies (Enami & Nandi 1977; Sheffield 1998).

Bien qu'intéressantes pour de nombreuses études, les cultures primaires ne constituent toutefois pas des systèmes homogènes puisque pendant la culture tous les types cellulaires présents ne vont pas se différencier de la même manière.

1.5.4. Cas particulier de la culture primaire des cellules épithéliales mammaires de lapin

Les premiers travaux utilisant des modèles *ex vivo* (explants de glande mammaire) ont été réalisés à partir de glandes de lapines en pseudogestation, déclenchée par injection intraveineuse de gonadotrophines. Ces glandes mammaires très semblables à celles retrouvées chez la lapine en début de gestation sont capables de synthétiser une forte quantité d'acides gras, essentiellement des acides octanoïques (C8:0) et décanoïques (C10:0) caractéristiques du lait de lapine, en réponse aux hormones lactogènes. Les quantités synthétisées sont comparables à celles observées avec des explants mammaires de lapines en lactation (Strong *et al.* 1972). La glande mammaire de lapine constitue donc un modèle pertinent pour les études *ex vivo*, en raison de sa simplicité d'obtention et de sa capacité à répondre aux stimuli hormonaux.

Des cultures primaires de CEM de lapine, isolées à mi-gestation, ont été utilisées afin de comprendre le rôle des interactions cellulaires sur l'induction et la maintenance d'un état de différenciation fonctionnelle, caractérisé par l'acquisition d'une polarité et d'une capacité sécrétoire. La synthèse de certaines protéines du lait peut être réalisée en culture primaire, dans des milieux sans sérum dans lesquels les agrégats de CEM peuvent être maintenus en survie. Un cocktail d'hormones lactogènes permet alors d'induire la synthèse et parfois la sécrétion de protéines du lait (Grabowski *et al.* 1991; Puissant & Houdebine 1991) ou la synthèse d'acides gras (Carrington *et al.* 1981).

Des travaux dans lesquels des cellules mammaires étaient cultivées sur matrice de collagène de type I ont montré la capacité de ces cellules à former une monocouche pouvant être apparentée à celle retrouvée dans un épithélium simple. Les cellules forment entre elles des jonctions serrées et développent des microvillosités au niveau du pôle en contact avec le milieu de culture. La présence de PRL dans le milieu, bien que n'induisant pas cette modification morphologique, est nécessaire au maintien de l'organisation de cette monocouche cellulaire. Cependant sur ce type de matrice fixe, les cellules ne synthétisent pas de composants du lait (Hauptle *et al.* 1983). Une matrice de gel de collagène flottant induit la formation d'une multicouche, composée d'une part, de cellules sécrétrices en contact avec le milieu de culture et, d'autre part, de cellules de type myoépithélial localisées entre les cellules sécrétrices et la matrice. Ces cellules semblent dériver des cellules sécrétrices dans la mesure où aucune synthèse d'ADN ni de division cellulaire n'est observée (Hauptle *et al.* 1983). En présence d'hormones lactogènes, ces cellules synthétisent des gouttelettes lipidiques ainsi que des protéines du lait sans toutefois les sécréter (Ip & Darcy 1996).

Le système le plus à même de reconstituer une différenciation fonctionnelle des CEM semble être la culture tridimensionnelle d'organoïdes, composés d'une cinquantaine de cellules épithéliales enrobées dans un gel de collagène ou dans une matrice extracellulaire d'origine tumorale (Ip & Darcy 1996). On observe alors une prolifération cellulaire avec des changements morphologiques importants. En effet les cellules deviennent cuboïdes et s'organisent en ébauches de canaux, terminés par des acini. Dans ce type de culture, deux types cellulaires sont présents : des cellules sécrétrices capables de synthétiser et sécréter des composants protéiques et lipidiques du lait et des cellules de type myoépithélial, situées en position basale. Des hormones telles que la progestérone ou la PRL sont nécessaires à l'établissement et au maintien d'une polarité et d'une capacité sécrétoire des cellules (Hauptle *et al.* 1983).

2. EFFETS DE L'ALIMENTATION SUR LA GLANDE MAMMAIRE

L'âge et le poids sont des facteurs essentiels dans le développement de la glande mammaire. Le poids est en relation avec l'alimentation et un grand nombre de travaux ont montré que celle-ci joue un rôle crucial dans le développement mammaire (Baldi *et al.* 2008). Etudier l'influence de la nutrition à diverses étapes de développement de la glande mammaire revêt donc une importance capitale et fait ainsi l'objet de nombreux travaux réalisés en utilisant des modèles animaux (Sejrsen 1994, par exemple).

2.1. Perturbations du développement mammaire induites à la puberté

Les besoins énergétiques à la puberté évoluent parallèlement à la courbe de croissance de l'individu et sont généralement proportionnels à son appétit. A l'adolescence, les individus doivent parvenir à maintenir une balance énergétique en équilibre et manger en suffisance ce dont ils ont besoin pour assurer une croissance et un développement optimaux. Cependant, on observe de plus en plus, dès la puberté, une alimentation déséquilibrée chez les jeunes. Différents facteurs à la fois sociaux, économiques ou culturels peuvent être associés à des dérèglements de la ration alimentaire ou à des comportements alimentaires modifiés comme l'anorexie ou la boulimie.

2.1.1. Cas de la sous nutrition

Des travaux étudiant les conséquences de restrictions alimentaires ou de régimes carencés en protéines ont été menés afin de permettre d'évaluer l'impact de la sous nutrition sur le développement mammaire. Il a ainsi été montré, dans un modèle porcin, qu'une restriction alimentaire de 20%, administrée après le sevrage, induit une forte diminution de la masse du tissu parenchymateux, alors qu'un régime plus ciblé, appauvri en lysine, au même stade n'était pas dommageable pour le développement mammaire à la puberté (Farmer *et al.* 2004). D'autres travaux utilisant des modèles bovins, ont renforcé ces observations en prouvant que les modulations hormonales importantes qui ont lieu à la puberté pouvaient être perturbées

par une restriction alimentaire (Renaville *et al.* 2000). Plus récemment, une étude allemande a relié le retard de croissance intra-utérin, largement dépendant des dérégulations alimentaires, avec des altérations des voies de signalisation qui sont connues pour influencer fortement le développement mammaire chez le rat à la puberté (Beinder *et al.* 2014).

2.1.2. Cas de la surnutrition

La prévalence de la surcharge pondérale et de l'obésité constitue aujourd'hui un véritable problème de santé publique, de par les nombreuses maladies qu'elle engendre. En particulier, l'augmentation de la surcharge pondérale et de l'obésité chez les enfants et les adolescents est à l'heure actuelle très préoccupante, dans la mesure où ses répercussions sur la santé peuvent se manifester longtemps après, pendant la vie adulte.

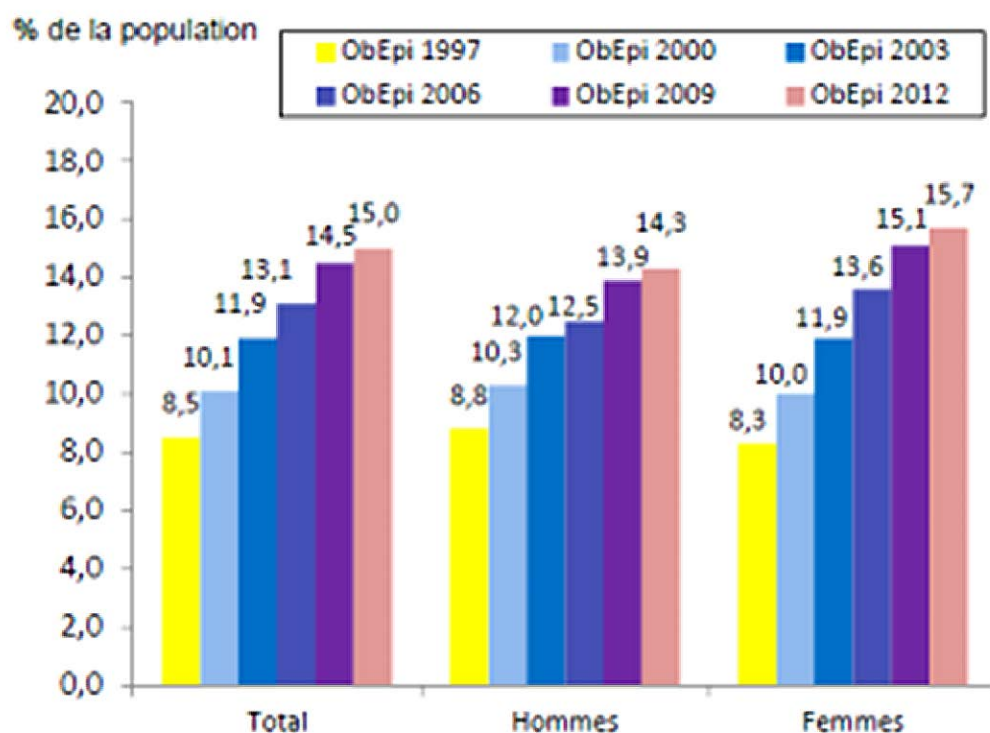


Figure 7 : Répartition des prévalences de l'obésité masculine et féminine depuis 1997
(d'après enquête ObEpi 2012)

La prévalence de l'obésité féminine en France tend à augmenter plus rapidement que l'obésité masculine, mais on observe chez les deux sexes une progression depuis 1997.

Chez les bovins, il a été montré que dans le cas de régimes hypercaloriques visant à obtenir une croissance rapide, les individus les plus gras au début de la puberté sont ceux qui ont le moins de tissu parenchymateux mammaire. Le tissu mammaire des génisses assujetties à un programme alimentaire de croissance accélérée contient davantage d'adipocytes que celui des génisses soumises à un programme de croissance lente (Capuco *et al.* 1995). Une part de ces altérations sur le développement mammaire, peut être due au fait que l'alimentation hypercalorique peut également induire l'avancement de l'âge de la puberté chez les génisses (Bergfeld *et al.* 1994). Des études complémentaires *in vitro* ont permis de mettre en relation ces observations avec la présence de leptine et de son récepteur au niveau des cellules mammaires prouvant ainsi le rôle de la leptine dans l'effet délétère des régimes hypercaloriques sur le développement mammaire (Silva *et al.* 2002).

Chez les rongeurs, l'obésité ou l'hyper-adiposité induite par un régime hypercalorique administré après le sevrage, est à l'origine d'une diminution de la croissance canalaire due à la réduction du nombre de ramifications et la largeur de canaux au cours des étapes précoces du développement mammaire (Kamikawa *et al.* 2009). Un déséquilibre alimentaire causé par un régime hyper-lipidique, majoritairement enrichi en graisses saturées, chez des souris pré-pubères, entraîne également une forte augmentation de la masse corporelle ainsi qu'une diminution du développement mammaire avec une prolifération réduite des CEM. Chez des femelles ovariectomisées, un phénotype similaire est associé, à une diminution de la capacité de réponse à un traitement aux œstrogènes nécessaires à la croissance épithéliale mammaire (Olson *et al.* 2010).

Il est cependant à noter que selon les modèles animaux utilisés et selon les souches au sein d'une même espèce, des résultats différents, si ce n'est contradictoires, sont observés. Par exemple, chez deux souches de souris, l'administration en période pubertaire, d'un régime riche en graisses, peut induire des effets inverses sur la prise de poids et sur le développement de la glande mammaire : la souche C57BL/6 montre une forte augmentation de poids et un développement mammaire restreint, contrairement à la souche BALB/c qui ne montre pas de prise de poids mais dont le développement mammaire semble accéléré (Olson *et al.* 2010).

Les effets à long terme de l'alimentation pendant la puberté ont également été mis en cause pour expliquer des cancers mammaires (Hilakivi-Clarke 2007). Des études sur des rongeurs ont pu mettre en évidence des effets différents de régimes plus ou moins riches en acides gras

polyinsaturés. Alors qu'un régime pauvre en acides gras polyinsaturés en position n-3 diminue l'incidence de tumeurs mammaires, un régime riche en ces même acides gras l'augmente, contrairement à un régime composé d'acides gras polyinsaturés en position n-6, qui n'a pas d'effet (Olivo & Hilakivi-Clarke 2005).

2.2. Perturbations du développement mammaire induites pendant la gestation

L'alimentation recommandée pendant la gestation diffère peu qualitativement de celle qui est conseillée de manière générale à l'individu adulte. En effet un ensemble de mécanismes se met en place au cours de la gestation pour couvrir les besoins en énergie, protéines, vitamines et minéraux liés à la croissance du fœtus et aux modifications de l'organisme maternel. On observe ainsi un accroissement de la prise alimentaire, une adaptation précoce du métabolisme de nombreux nutriments, une mobilisation des réserves de l'organisme maternel pour les besoins du fœtus et des modifications du métabolisme placentaire. Toute modification qualitative ou quantitative de l'alimentation, avant ou pendant la gestation, va toutefois engendrer des conséquences importantes non seulement pour la mère et le fœtus mais également pour le jeune dès sa naissance et jusqu'à son devenir en tant qu'adulte.

2.2.1. Cas de la sous nutrition

La dénutrition va influencer le développement mammaire en réduisant le rapport protéines/ADN. Ainsi, chez des rats soumis à une restriction alimentaire pendant la gestation, le nombre et la taille des cellules du parenchyme mammaire semblent réduits, tandis que l'espace luminal inter-alvéolaire est accru (Rosso *et al.* 1981). Une sous-nutrition causée par l'administration d'un régime hypoprotéique induit une involution mammaire et une diminution importante du développement lobulo-alvéolaire en fin de gestation au profit d'une infiltration massive de cellules adipeuses. Celle-ci n'est plus observée après l'introduction d'une alimentation hyperprotéinée (Goodwill *et al.* 1996; Bautista *et al.* 2013), suggérant que dans ce modèle animal, le facteur nutritionnel semble être à lui seul responsable de l'atrophie mammaire.

La sous nutrition, ou la malnutrition, pendant la gestation impacte fortement l'organisme maternel mais également la vie du jeune dans la mesure où des conséquences à long terme peuvent être observées dans la descendance. Plusieurs études, réalisées chez des rongeurs, ont décrit les conséquences des variations de restriction alimentaire maternelle pendant toute la durée de la gestation sur le développement des petits. Que cette restriction soit sévère (50% de la ration normale (Holemans *et al.* 1999)) ou drastique (réduction de 70% de la ration normale (Woodall *et al.* 1996; Vickers *et al.* 2000)), les nouveau-nés naissent avec un faible poids et à long terme affichent les conséquences délétères de cette carence alimentaire maternelle (obésité, syndrome métabolique, ...). En revanche, une restriction qualitative, telles que l'administration de régimes pauvres en caséines en début ou en fin de gestation peut aboutir à un retard de croissance intra-utérin (RCIU) des petits alors que ce même régime, administré en milieu de gestation peut donner des nouveau-nés avec un plus gros poids de naissance (Langley-Evans 1998).

2.2.2. Cas de la surnutrition

La variation quantitative de la ration calorique est peu utilisée pour étudier l'impact de la surnutrition dans la mesure où la plupart des espèces régule leur prise alimentaire en fonction de leurs besoins énergétiques. Les modèles nutritionnels vont alors utiliser comme levier des variations qualitatives de l'alimentation via des apports déséquilibrés, souvent en sucres et/ou en graisses. Ces modèles permettent ainsi de mimer les effets de variations de l'alimentation humaine en regard de contextes socio-économiques, culturels et environnementaux.

Chez le lapin, un régime obésogène enrichi en graisses et en sucres démarré avant la puberté et poursuivi pendant la gestation entraîne un développement anormal de la glande mammaire à mi-gestation, tant sur le plan morphologique que sur le plan fonctionnel. En effet, la proportion d'épithélium sécrétoire est significativement plus importante dans le tissu mammaire des animaux soumis au régime obésogène. De plus, chez ces derniers, les canaux mammaires contiennent des produits denses, rappelant un phénotype de fin de gestation. Ce développement mammaire anormal se traduit au niveau fonctionnel par une abondante accumulation de protéines du lait (caséines) et de lipides au niveau de l'épithélium sécrétoire et des canaux (Hue-Beauvais *et al.* 2011). En revanche, des souris rendues obèses par l'ingestion d'un régime obésogène avant l'accouplement et jusqu'à mi-gestation présentent

d'une part, des problèmes de reproduction (taux d'infertilité élevés et forte mortalité embryonnaire) et, d'autre part, des anomalies du développement lobulo-alvéolaire durant la gestation, associées à une diminution d'expression des protéines majeures du lait (Flint *et al.* 2005).

Les effets de ces régimes à forte teneur en lipides, administrés avant et pendant la gestation, ont également été mis en évidence dans le développement et l'organisation de structures cérébrales telles que l'hippocampe dès le stade embryonnaire, suggérant des modifications à long terme et un impact important sur le devenir de la génération suivante (Niculescu & Lupu 2009). Des modèles nutritionnels induisant une hypercholestérolémie maternelle ont été développés chez la lapine. Ces études ont permis d'illustrer l'importance de la qualité de la nutrition maternelle avant et durant la gestation dans l'établissement et le contrôle de la croissance au niveau embryonnaire, fœtal, néonatal et adulte (Picone *et al.* 2011). Certains travaux montrent des effets protecteurs inattendus contre l'obésité, de régimes hypergras administrés durant la gestation et la lactation. Ces mêmes régimes, administrés à la descendance après le sevrage se révèlent alors sans effet, mettant ainsi en cause des mécanismes de régulation centraux chez le rat (Couvreur *et al.* 2011).

2.3. Perturbations du développement mammaire induites durant la lactation

Les perturbations induites par l'alimentation sur la lactation peuvent être de deux ordres : d'une part, un effet direct sur la mère, consommatrice de cette alimentation dérégulée et sur le lait qu'elle produit ; d'autre part, un effet indirect sur le jeune allaité.

La quantité de lait produit est variable selon les espèces : de 1 l/jour chez la femme, elle peut atteindre 30 l/jour chez la vache. Le lait est considéré comme l'aliment parfait pour la croissance du mammifère en période postnatale. La croissance et la santé du petit dépendent exclusivement du lait maternel ou artificiel, de manière quantitative mais également qualitative. C'est pourquoi tout évènement engendrant une modification de l'allaitement ou de la qualité du lait, qu'il soit du au comportement de la mère, à son état de santé ou à son alimentation, retentit très fortement sur le devenir du jeune. De plus, des travaux ont décrit

l'influence de la nutrition maternelle pendant la gestation ou la lactation sur le comportement maternel de certaines femelles vis-à-vis de l'allaitement de leur petits (Connor *et al.* 2012).

2.3.1. Cas de la sous nutrition

Dans un modèle de rat dont les apports nutritionnels ont été fortement réduits durant le dernier tiers de la gestation et au cours de la lactation, les ratons souffrent d'un RCIU de 15 à 20%. Ce retard de croissance s'accroît durant la lactation (Howie *et al.* 2012). Il reste maintenant à déterminer si les altérations programmées pendant la gestation ne pourraient pas être déprogrammées pendant la lactation.

L'importance de l'alimentation maternelle pendant la lactation a été illustrée par des expériences d'adoptions croisées chez le rat. Elles consistent à faire allaiter des petits normotrophes ou présentant un RCIU par des mères qui sont ou non dénutries. La comparaison de la croissance de la descendance a montré que les petits présentant un RCIU mais qui sont allaités par des mères non dénutries, rattrapent très vite leur retard (Wattez *et al.* 2014) et peuvent même présenter une forte susceptibilité à l'obésité (Lee *et al.* 2013). La nutrition maternelle pendant la lactation a donc bien une influence sur la masse pondérale, dans un modèle rongeur. Il a également été montré qu'un des effets de la dénutrition maternelle est d'augmenter considérablement les taux de leptine et de triglycérides plasmatiques du jeune (Lee *et al.* 2013). Toutefois le modèle d'adoption croisée peut permettre d'enrayer les effets délétères engendrés par la dénutrition durant la gestation (Wattez *et al.* 2014).

2.3.2. Cas de la surnutrition

Chez les bovins, l'utilisation de régimes hypercaloriques, administrés avant la puberté et visant à obtenir une croissance rapide réduit la production laitière future. Cette corrélation a été expliquée d'une part, par la croissance rapide de l'individu qui entraîne un dépôt adipeux trop important au niveau du pis et, d'autre part par des changements hormonaux, induits par les régimes hypercaloriques qui retardent le développement mammaire (Sejrsen *et al.* 2000). Ces hypothèses illustrent les effets de l'alimentation de l'individu sur la production laitière

mais n'apportent pas d'information sur les effets de l'alimentation durant la seule période de lactation.

Toujours dans une optique d'amélioration des performances d'élevage chez les lagomorphes, des tests alimentaires, concernant la teneur en fibres, ont été réalisés chez les lapines allaitantes afin d'optimiser la reproduction durant la première lactation, mais n'ont pas montré les effets bénéfiques attendus malgré une augmentation de la prise alimentaire des lapines (Arias-Alvarez *et al.* 2010).

Chez les rongeurs, des travaux ont été entrepris pour discriminer l'effet du lait de l'effet *in utero* provoqué par l'administration d'un régime hyper-gras administré à la mère, sur l'incidence du syndrome métabolique chez la descendance. Dans ces conditions expérimentales, l'alimentation de la mère durant la période de lactation a un effet aggravant sur la survenue de ce syndrome, alors que le statut nutritionnel *in utero* jouerait un rôle beaucoup moins important (Masuyama & Hiramatsu 2014). Des régimes dits obésogènes pour leurs apports excessifs en sucres et en graisses, administrés chez des souris C57BL/6 avant l'accouplement et jusqu'à la lactation, induisent non seulement l'obésité de ces femelles mais également une production laitière modifiée qualitativement au regard de la modification des paramètres sanguins des animaux. Cette exposition des petits à l'obésité maternelle mène au développement à l'âge adulte d'une forte adiposité et de dysfonctionnements cardiovasculaires et métaboliques (Samuelsson *et al.* 2008).

A côté des effets sur le développement de la glande mammaire, la nutrition peut jouer un rôle déterminant dans la synthèse et la sécrétion du lait. Dans l'espèce humaine, l'impact de l'obésité sur l'allaitement maternel reste mal connu. Les femmes obèses ont souvent des difficultés pour initier l'allaitement dans la première semaine post-partum à cause d'une réponse à la PRL déficiente (Rasmussen & Kjolhede 2004). Par ailleurs, aux Etats-Unis, une étude a démontré que les femmes en surpoids ou obèses au moment de la naissance de leur enfant, ont de grands risques d'être incapables d'allaiter. Lorsque la lactation s'initie, elle s'arrête au deuxième jour (Chapman & Perez-Escamilla 1999). En effet, la lactogénèse des femmes obèses est souvent retardée et dure moins longtemps (Rasmussen *et al.* 2001; Oddy *et al.* 2006).

Bien avant l'accouplement, la santé et le statut nutritionnel de la mère ont donc une profonde influence sur le développement du fœtus, sur celui de la glande mammaire maternelle, source de la première alimentation du jeune et donc sur le développement ultérieur de ce jeune. Il est maintenant établi que le lait est un fluide complexe qui exerce ses effets bien au-delà de sa simple valeur nutritionnelle et rares sont les travaux permettant de mesurer ces effets, indépendamment de ceux exercés *in utero*. Une connaissance claire des facteurs qui affectent la capacité de la mère à produire un lait en quantité suffisante et de composition appropriée pour le jeune est indispensable afin de pouvoir décrire les effets de ce lait sur la descendance et d'en comprendre les mécanismes.

3. LA LEPTINE

3.1. Généralités

La leptine (du grec *leptos* : mince) est le produit du gène *ob* (ou LEP), situé sur le chromosome 7 chez l'homme et le lapin et sur le chromosome 6 chez la souris. Ce gène fut cloné pour la première fois sous sa forme mutée, à partir du tissu adipeux de souris obèses *ob/ob*. Bien que la production de leptine soit principalement due aux adipocytes blancs, de nombreux autres tissus synthétisent cette protéine à des taux inférieurs, mais néanmoins significatifs, tels que le placenta (Hoggard *et al.* 1997), les ovaires (Diamanti-Kandarakis & Kandarakis 2004), le muscle squelettique (Wang *et al.* 1998), la glande mammaire (Smith-Kirwin *et al.* 1998), ou encore l'épithélium gastrique (Bado *et al.* 1998; Sobhani *et al.* 2000).

La leptine est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et la balance énergétique (Zhang *et al.* 1994) et sa concentration circulante est proportionnelle à l'adiposité de l'individu. C'est une protéine mature de 146 acides aminés, ne possédant pas de modification post-traductionnelle, dont le poids moléculaire est de 16 kDa. La leptine possède la structure tridimensionnelle classique des cytokines de type I avec quatre hélices alpha antiparallèles (Zhang *et al.* 1997). La leptine possède une séquence très conservée entre espèces, la comparaison de séquences protéiques entre homme, souris et lapin révèlent une similarité de l'ordre de 80% (Doyon C 2001) (Figure 8).

Lorsque les réserves adipeuses augmentent, la leptine agit au niveau hypothalamique pour réduire l'appétit en créant la sensation de satiété et augmenter la dépense énergétique. Inversement, une diminution du taux de leptine circulante induit à la fois une augmentation de la sensation de faim et une diminution de cette dépense énergétique (Flier 1998).

La démonstration de l'implication de la leptine dans la régulation de l'adiposité corporelle et de l'obésité a été facilitée par l'étude de différents modèles animaux portant des mutations récessives à l'état homozygote, tels que les souris *ob/ob* qui sont porteuses d'une mutation naturelle dans le gène de la leptine et développent une forte obésité en relation avec de sévères perturbations de la prise alimentaire et de la balance énergétique.

3.2. Récepteurs et transduction du signal

Le récepteur de la leptine (Ob-R) fut découvert environ un an après la leptine (Tartaglia *et al.* 1995). Ce gène est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme, le chromosome 4 chez la souris et le chromosome 13 chez le lapin. Les récepteurs de la leptine appartiennent à la famille des récepteurs aux cytokines de classe I, incluant entre autres, le récepteur de la PRL et de la GH, le récepteur du Leukemia Inhibitory factor (LIF) et celui de l'Interleukine 6 (Il-6) (Bazan 1990; Tartaglia *et al.* 1995). Plusieurs isoformes de l'Ob-R ont été mises en évidence. Générées par épissage alternatif, leur taille varie en fonction de la présence ou non du domaine transmembranaire ainsi que de la longueur de leur chaîne intracellulaire C-terminale (Gorska *et al.* 2010). Le nombre d'isoformes peut varier selon l'espèce : par exemple, actuellement 6 isoformes ont été mises en évidence chez la souris, mais le nombre d'isoformes reste encore à caractériser chez le lapin.

Les isoformes du récepteur de la leptine, hormis l'isoforme soluble Ob-Re, sont regroupées sous deux appellations en fonction de la longueur de leur domaine intracellulaire (Figure 9). Le groupe des récepteurs « courts », noté Ob-Rs (ou Ob-Ra) est constitué des isoformes a, c, d et f qui possèdent une région cytoplasmique comprise entre 32 et 40 acides aminés, alors que le récepteur long, Ob-Rl (ou Ob-Rb) est composé d'un domaine intracellulaire de 302 résidus (Sweeney 2002).

Il existe également des mutations récessives à l'état homozygote qui affectent le gène du récepteur de la leptine (Bray & York 1979). La mutation chez la souris *db/db* introduit un site d'épissage et entraîne le remplacement de l'Ob-Rb par l'isoforme Ob-Ra. Les souris *dbPas/dbPas* et *db3J/db3J* portent des mutations qui raccourcissent encore le cadre de lecture. Ces isoformes n'ont plus de domaines transmembranaires. Chez le rat Zucker *fa/fa*, la mutation au niveau du domaine extracellulaire du récepteur (Q269P) entraîne une diminution de la capacité à lier la leptine (figure 9).

Les différentes isoformes de l'Ob-R partagent la même chaîne N-terminale correspondant à un domaine extracellulaire de 816 acides aminés, permettant de fixer la leptine et pour les isoformes non solubles un domaine transmembranaire. Ce domaine extracellulaire présente une grande homologie de séquence avec le récepteur du G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) et le récepteur de la gp130 (glycoprotéine 130), du LIF (leukemia inhibitory

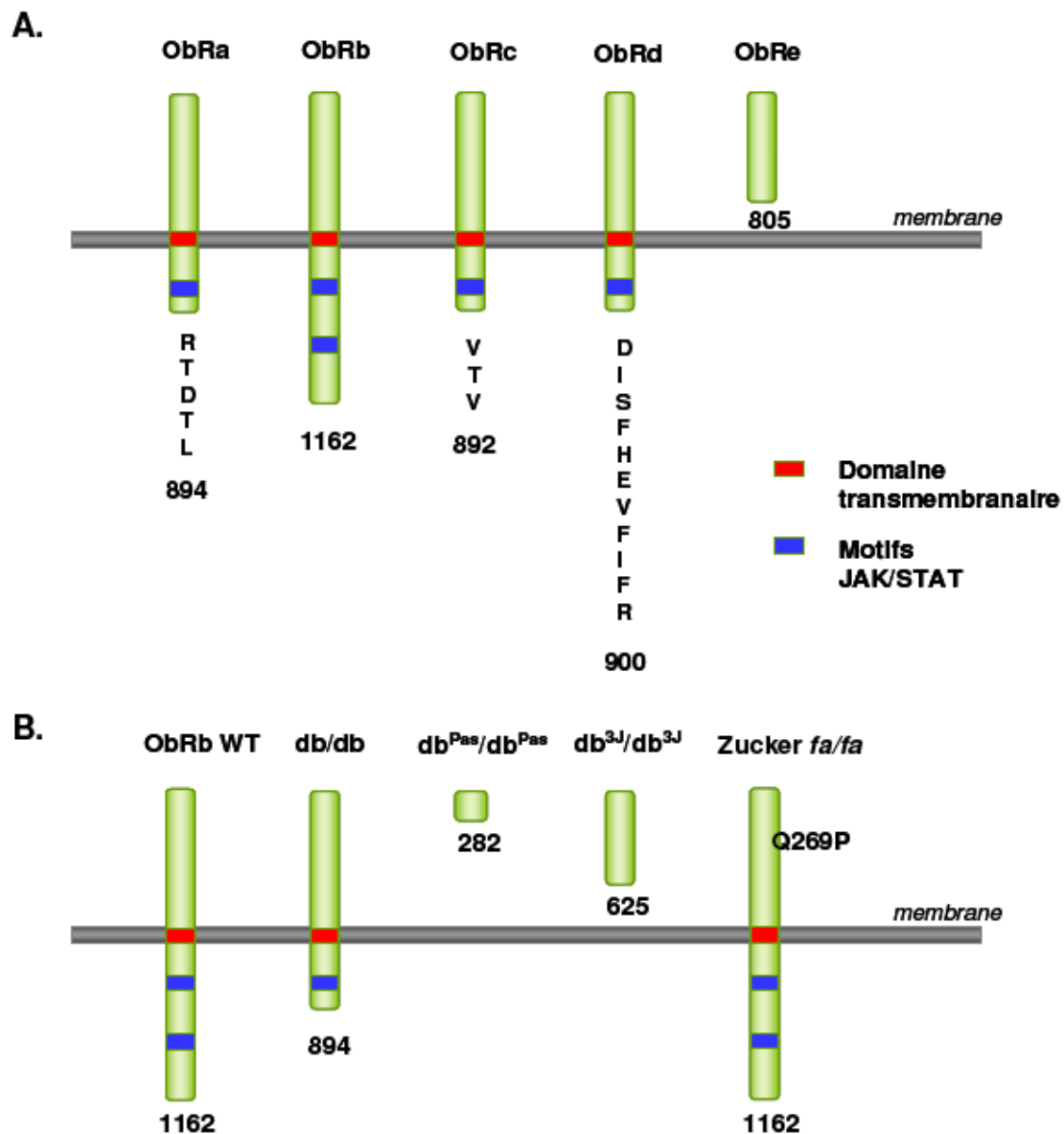


Figure 9 : Représentation schématique des différentes isoformes du récepteur de la leptine et des mutations chez les rongeurs

(A) Principales isoformes transmembranaires Ob-Ra, b, c et d (l'isoforme f n'est pas représentée) et soluble ObRe.

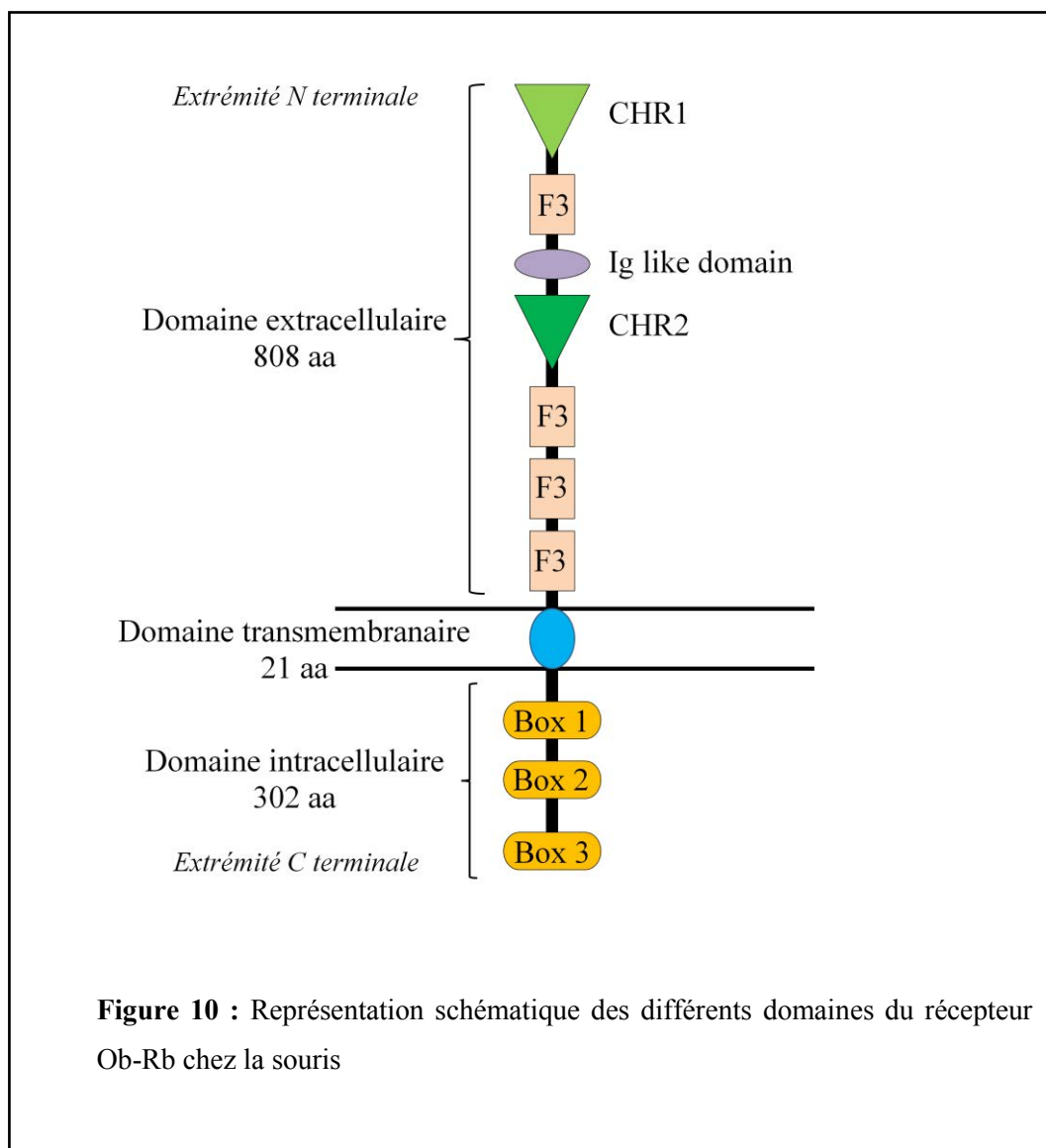
(B) Principales mutations des isoformes du Ob-R

(d'après Friedman JM., 1998)

factor) et de l'IL-6. Ce domaine est composé d'une association de plusieurs domaines communs aux autres membres des récepteurs de la famille des cytokines de classe I. Comme indiqué sur la figure 10, il se compose de deux domaines "cytokine receptor homology

domain", CRH1 et CRH2, contenant des motifs caractéristiques tryptophane sérine (WSXWS), d'un domaine "Immunoglobulin-like" (Ig-like) et de 4 domaines "fibronectin-type 3" (F3). Le site de liaison de la leptine se définit par l'association du domaine CRH2 avec un motif F3 (Fong *et al.* 1998; Mancour *et al.* 2012). Les domaines Ig-like et CRH1 sont indispensables à l'activation de l'Ob-R par la leptine (Zabeau *et al.* 2003).

Le domaine intracellulaire du récepteur est composé de motifs juxtamembranaires riches en résidus proline, de type « box 1 » sur lesquels s'associent les protéines JAK. Pour obtenir une activation maximale des JAK, il est aujourd'hui admis qu'une séquence additionnelle dite « box 2 » est également nécessaire. Une séquence « box 3 » présentant le motif tyrosine-X-X-glutamine (YXXQ) joue également un rôle très important dans la transduction du signal. Ces deux dernières séquences ne sont présentes que dans la forme longue du récepteur, alors que la séquence « box 1 » est également présente au niveau des isoformes courtes (Baumann *et al.* 1996).



Les récepteurs de la leptine ont été mis en évidence dans différents tissus, soulignant fortement les nombreux rôles de ce couple hormone/récepteur. L'isoforme longue du récepteur de la leptine est très fortement exprimée dans l'hypothalamus (Cohen *et al.* 1996). De forts taux d'expression des récepteurs courts tels que les isoformes a et c ont été mis en évidence au niveau du plexus choroïde et des capillaires cérébraux, suggérant leur rôle important dans le transport à travers la barrière hémato-encéphalique (Tartaglia *et al.* 1995). L'expression des différentes isoformes du Ob-R à des niveaux fonctionnels n'est pas limitée au système nerveux central mais a été également démontrée au niveau de plusieurs tissus périphériques parmi lesquels l'utérus (Gonzalez & Leavis 2003), l'estomac (Sobhani *et al.* 2000), l'intestin (Sukhotnik *et al.* 2009), le muscle (Wang *et al.* 1998), le poumon (Bergen *et al.*, 2002), l'épithélium olfactif (Baly *et al.* 2007), le placenta (Hoggard *et al.* 1997), l'ovaire (Zerani *et al.*, 2004), la glande mammaire (Sayed-Ahmed *et al.* 2004), ou encore le tissu adipeux (Kielar *et al.* 1998).

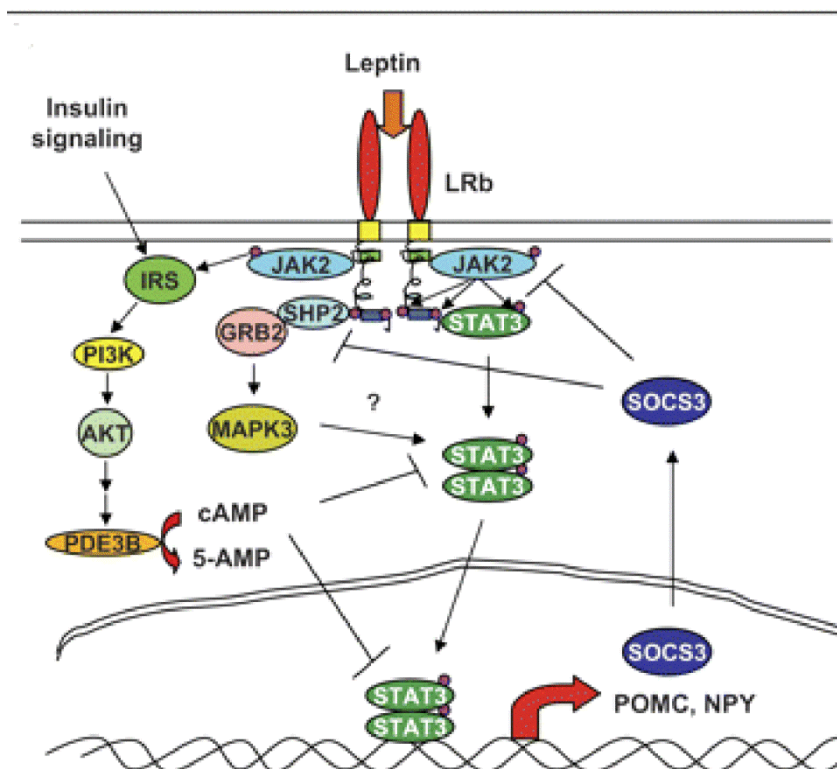
Si les domaines extracellulaires des Ob-R sont impliqués dans la fixation du ligand, ce sont les domaines cytoplasmiques qui vont permettre l'activation, puis l'inactivation des voies de signalisation impliquées dans les rôles biologiques de la leptine.

Toutefois, les récepteurs présents sur la membrane des cellules sont dans un état de pré-dimérisation et un changement de conformation du domaine extracellulaire est induit par l'interaction avec l'interaction avec la leptine (

Figure 11). Une fois la leptine liée au domaine extracellulaire un changement conformationnel va s'opérer afin d'initier la cascade de transduction. En tant que membre de la famille des cytokines de classe I, l'Ob-R ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque mais est constitutivement associé avec des Janus kinases de type 2 (JAK2) qui seront activées suite à l'interaction leptine/Ob-R. Cette activation initiale des Janus kinases par auto-phosphorylation va entraîner une phosphorylation des tyrosines du domaine intracellulaire des Ob-R (Couturier & Jockers 2003). S'en suit alors un processus d'activation et de phosphorylation de différentes protéines impliquées dans les voies de signalisation induites par la leptine.

La voie majeure correspond au recrutement et à l'activation par phosphorylation d'un facteur de transcription cytoplasmique, appartenant à la famille des Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) et plus particulièrement STAT3 qui va être recruté par son domaine d'homologie *Src*. L'activation par phosphorylation suivie de l'homodimérisation et de la translocation nucléaire de STAT3 mène à l'induction de gènes cibles porteurs de séquences spécifiques (Zabeau *et al.* 2003). La voie JAK2/STAT3 est majoritaire dans la transduction du signal de la leptine via l'Ob-Rb. Des travaux ont montré en effet que l'injection de leptine à des doses physiologiques, entraîne rapidement l'activation exclusive de STAT3 au niveau de l'hypothalamus chez des souris (Ghilardi *et al.* 1996). Cependant,

une
de STAT5 a
également
dans des
épithéliales
et dans des
hépatiques
(Morton *et*
Briscoe *et*
De plus



activation
été
montrée
cellules
intestinales,
cellules
humaines
al. 1998;
al. 2001).

l'administration de leptine au niveau périphérique active STAT1 et STAT3 dans des adipocytes de rat (Siegrist-Kaiser *et al.* 1997).

Figure 11 : Voies de signalisation du récepteur de la leptine
(d'après Gao Q., 2007).

La fixation de la leptine sur son récepteur peut également conduire à l'activation par phosphorylation des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) qui jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie énergétique de la cellule. La cascade de transduction médiée par ces protéines est activée par la leptine via l'Ob-Rb et plus faiblement l'Ob-Ra (Bjorbaek *et al.* 1997). Bien que l'ensemble des protéines impliquées dans cette cascade soit encore mal défini, il a été montré qu'en fin de processus l'activation de MAPK-1/2 induit sa translocation nucléaire. Dans le noyau, les MAPK vont réguler l'expression de gènes cibles, tels que *c-fos*, impliqués principalement dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires (Wauman & Tavernier 2011).

La voie des Insulin-Receptor Substrate (IRS) et de la Phosphatidyl-Inositol 3-kinase (PI3K) a été impliquée dans la transduction du signal de la leptine. Des souris, chez lesquelles le gène codant IRS-2 a été inactivé, présentent une augmentation de la prise alimentaire ainsi qu'une baisse de leur dépense énergétique (Withers *et al.* 1998). Le récepteur de la leptine activé peut donc également recruter certains acteurs de cette voie. De plus, il existe une interconnexion entre les voies de signalisation de la leptine et de l'insuline qui sont toutes deux impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire (Niswender & Schwartz 2003). Enfin, il a été montré que la voie IRS/PI3K est indispensable pour médier les effets anorexigènes de la leptine et de l'insuline au niveau central (Sweeney 2002). L'activation de ces différentes voies converge au final à la modulation de l'expression des gènes cibles impliqués notamment dans le contrôle du métabolisme énergétique, de la différenciation, de la prolifération cellulaire et de l'apoptose.

Les deux principales voies activées par la leptine sont régulées négativement de deux manières : soit par une action des protéines Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS), soit par une internalisation du complexe hormone/récepteur. Les protéines SOCS sont impliquées dans le rétrocontrôle des voies de transduction induites par de nombreuses cytokines. La

synthèse des protéines SOCS est activée par les protéines STAT. Les protéines SOCS en retour régulent négativement la synthèse de STAT, ce qui a pour conséquence une inhibition des voies JAK/STAT, MAPK et IRS/PI3K. *In vitro* la leptine induit l'expression de SOCS-3 conduisant à une diminution de l'activation de STAT3, de JAK2 et de ERK (Dunn *et al.* 2005). Il existe également un phénomène de compétition, où SOCS et STAT se retrouvent antagonistes pour la fixation au site de phosphorylation de JAK2. De plus, chez le rat, une déficience en SOCS-3 induit une sensibilité accrue à la leptine et conduit à une résistance à l'obésité induite par l'alimentation (Howard *et al.* 2004). Une autre voie d'inactivation consiste à internaliser le complexe hormone-récepteur par un mécanisme dépendant de la clathrine, et à le dégrader ensuite dans les lysosomes (Belouzard & Rouille 2006).

3.3. Principales fonctions

Au vu des nombreux tissus exprimant le récepteur de la leptine, les actions de cette protéine apparaissent extrêmement diverses. En effet, la leptine intervient dans des processus biologiques très variés tels que la thermorégulation, la reproduction, la fonction thyroïdienne ou encore l'immunité (Baratta 2002).

Le mode d'action de la leptine est très complexe car il est la résultante d'effets directs et indirects, centraux et périphériques, en interaction ou non avec d'autres hormones, comme mentionné en 3.4, et d'autres facteurs. La leptine peut effectivement agir au niveau de cellules cibles et en moduler la différenciation et l'activité via ses récepteurs. Elle peut également contrôler des fonctions tissulaires, via l'hypothalamus en activant ou inhibant certaines voies ou en modulant la production d'hormones. Au niveau périphérique, la synthèse locale de leptine a été mise en évidence dans certains tissus, dans certains états physiologiques, attribuant ainsi à la leptine un rôle de facteur de croissance ou de différenciation, capable de moduler *in situ* la croissance ou la fonctionnalité cellulaires (Ahima & Flier 2000; Baratta 2002; Ronti *et al.* 2006).

3.3.1. Métabolisme des adipocytes

Le tissu adipeux a été initialement considéré comme l'unique source de production de leptine. Cependant les effets de la leptine sur le métabolisme des adipocytes sont peu documentés. Le

tissu adipeux exprime les isoformes longues et courtes de l'Ob-R (Kielar *et al.* 1998), lui permettant ainsi une potentielle auto-régulation de la synthèse de leptine. Des études menées chez le rat ont montré que la leptine inhibait l'accumulation de lipides dans les adipocytes en inhibant la synthèse *de novo* d'acides gras (William *et al.* 2002). De la même manière chez la souris, la leptine stimule la lipolyse dans les adipocytes isolés, ajoutant des arguments pour un possible rôle autocrine et/ou paracrine de la leptine (Fruhbeck *et al.* 1997). D'autres travaux, utilisant des ARN antisens, ont montré qu'une diminution de l'expression des isoformes longues et courtes de l'Ob-R au niveau des adipocytes blancs augmentait la prise de poids, la quantité de masse grasse et induisait une résistance à l'insuline prouvant ainsi l'importance de ces récepteurs dans le maintien de la balance énergétique (Huan *et al.* 2003).

3.3.2. Prise alimentaire

La leptine, dont les niveaux circulants reflètent l'état des réserves adipeuses, est le médiateur « clé » qui permet d'assurer le relais entre le tissu adipeux et le système nerveux central responsable de l'adaptation de la prise alimentaire. La découverte de l'influence de la leptine sur la prise alimentaire et la régulation de la masse corporelle, a fait de cette hormone une cible dans l'étude de l'obésité. La plupart des individus obèses présentent des niveaux de leptine circulante élevés, sans toutefois pouvoir y répondre de manière adéquate. Cet état d'hyperleptinémie est caractéristique d'un état de résistance à la leptine, dont les mécanismes responsables peuvent être une déficience des récepteurs, de la signalisation ou de la transduction du signal (Munzberg *et al.* 2005). Deux mécanismes moléculaires responsables de cette leptino-résistance ont été identifiés : d'une part une altération du transport de la leptine vers le cerveau et notamment l'hypothalamus qui est le site d'action critique pour la régulation de la balance énergétique (Caro *et al.* 1996), et d'autre part, une altération de l'activateur du OB-R au niveau du noyau arqué hypothalamique, ce qui expliquerait la diminution de l'effet anorexigène de la leptine (Balland & Prevot 2014).

L'hypothalamus, est un organe essentiel pour le contrôle de l'homéostasie énergétique en général et la régulation de l'appétit en particulier. C'est le centre vers lequel convergent les signaux multiples impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire et régule ainsi l'ensemble des événements depuis le déclenchement de la sensation de faim et l'initiation de la prise alimentaire, jusqu'à la sensation de satiété et la fin du repas. Parmi ces effets très divers intégrés par les différentes régions de l'hypothalamus on peut citer comme exemples,

la distension de l'estomac, les variations de la glycémie, de l'insulinémie ou de la leptinémie. La région hypothalamique majeure impliquée dans le mode d'action de la leptine est le noyau arqué qui concentre l'essentiel des récepteurs longs. Le rôle essentiel de cette zone a été mis en évidence d'une part, par l'injection de leptine *in vivo* au niveau du noyau arqué qui suffit à provoquer une réponse anorexigène chez le rat (Sato *et al.* 1997) et, d'autre part, par l'absence de réponse à une injection intracérébrale de leptine chez des animaux dont le noyau arqué a été détruit (Dawson *et al.* 1997). Une ablation des neurones exprimant spécifiquement le récepteur Ob-Ra conduit à l'obésité (excès de poids par augmentation de la masse adipeuse défini par un indice de masse corporelle IMC>30), démontrant clairement l'implication de la leptine au niveau central dans la régulation de la masse corporelle (Zabeau *et al.* 2003). Plus récemment, des travaux réalisés chez des souris obèses (mutation *db/db* ou alimentation par un régime enrichi en graisses) montrent que la leptine reste piégée chez ces animaux dans des cellules gliales, appelées tanocytes, situées dans l'éminence médiane qui représente la porte d'entrée pour la leptine vers le cerveau (Balland *et al.* 2014).

3.3.3. Rôle immunitaire

Le rôle de la leptine dans l'immunité et l'inflammation a été mis en évidence par l'observation du phénotype des souris déficientes en leptine (*ob/ob*) ou en récepteur de la leptine (*db/db*). Les souris *ob/ob*, montrent une forte augmentation de la mortalité suite à une infection, probablement due à une modification de la production des cytokines de l'immunité contrôlée par la leptine (Karmiris *et al.* 2008). Les souris *db/db* quant à elles sont immuno-déprimées, leurs cellules spléniques sont incapables de se multiplier et de répondre à des agents mitogènes (Mandel & Mahmoud 1978). Les récepteurs de la leptine sont en effet présents dans les cellules immunitaires et hématopoïétiques. La leptine stimule la prolifération de ces dernières ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'un état inflammatoire « à bas bruit » (Gainsford *et al.* 1996; Procaccini *et al.* 2012).

3.3.4. Rôle au niveau du tractus digestif

La mise en évidence de la leptine et de ses récepteurs dans l'estomac, l'intestin, le pancréas, le foie, et le fait que le tractus gastro-intestinal soit la première interface rencontrée par les

aliments après leur ingestion, suggèrent un rôle important de la leptine à ce niveau. La sécrétion de leptine au niveau de l'épithélium gastrique a été mise en évidence chez l'homme (Sobhani *et al.* 2000) et le rat (Bado *et al.* 1998). La leptine atteint ensuite l'intestin dont les cellules semblent être des cibles privilégiées. Des études réalisées chez le porc ont montré un effet de la leptine sur la morphologie de la muqueuse intestinale lié à une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales ainsi qu'à une augmentation de l'absorption des nutriments (Wolinski *et al.* 2003). Des études plus récentes impliquent la leptine dans la modulation du microbiote intestinal (Rajala *et al.* 2014) ainsi que dans les fonctions de réparation et de protection de l'épithélium intestinal lors d'épisodes inflammatoires (Sitaraman *et al.* 2004). L'ensemble de ces observations est en faveur d'un rôle de la leptine dans la mise en place, la maturation, le maintien du tractus gastro-intestinal ainsi que l'absorption et la transformation des nutriments..

3.3.5. Reproduction

Les souris *ob/ob* et *db/db* chez lesquelles la leptine est inexistante ou inactive manifestent différents troubles physiologiques, dont l'un des plus importants est l'infertilité. Ces dysfonctionnements du système reproducteur peuvent être contrecarrés par un traitement par la leptine (Malik *et al.* 2001).

La leptine a été largement impliquée dans l'établissement de la puberté. Des souris déficientes en leptine sont infertiles en raison d'un développement insuffisant de l'appareil reproducteur à la puberté, probablement dû à une synthèse et une sécrétion altérées de stéroïdes et de gonadotrophines (Elias & Purohit 2013). La leptine agirait sur ses récepteurs situés au niveau de la région pré-optique de l'hypothalamus pour réguler la sécrétion de gonadolibérine (GnRH) capable de stimuler la synthèse des gonadotrophines (Bellefontaine *et al.* 2014). Inversement, chez des souris transgéniques surexprimant la leptine, la maturité de l'appareil reproducteur est accélérée ainsi que la mise en place des cycles oestriens et de la capacité reproductrice. Les mêmes résultats ont été obtenus après administration de leptine à des souris normales (Ahima *et al.* 1997; Yura *et al.* 2000). Par ailleurs, des expériences d'injection de leptine à des femelles *ob/ob*, permettant de restituer à ces souris une fonction reproductrice, montrent que la leptine est essentielle pour les étapes de pré implantation et/ou d'implantation du fœtus. Ces observations ont été confirmées par une expression importante de leptine au niveau des embryons précoces (Malik *et al.* 2001; Schulz & Roberts 2011).

Au cours de la gestation qui représente un état physiologique particulier, le métabolisme maternel se modifie : un état de résistance à la leptine s'installe et permet d'augmenter la prise alimentaire et de favoriser ainsi l'augmentation des réserves énergétiques mobilisables par le fœtus en développement et préparer la lactation (Mounzih *et al.* 1998; Grattan *et al.* 2007). Le rôle pouvant être joué par la leptine au niveau du développement embryonnaire et fœtal est lié à la découverte de la synthèse de leptine par le placenta. Cette production a également été mise en évidence au niveau des cellules du trophoblaste dans différentes espèces dont la femme et la souris (Hassink *et al.* 1997; Hoggard *et al.* 1997). Chez ces deux espèces, les niveaux de leptine maternelle, placentaire et fœtale augmentent progressivement jusqu'en fin de gestation et diminuent en fin de lactation (Schubring *et al.* 1997; Garcia *et al.* 2000). La leptine placentaire est essentiellement sécrétée au niveau de la circulation maternelle, mais une faible proportion semble également délivrée dans la circulation fœtale (Hoggard *et al.* 2001). Cette quantité pourrait ainsi s'ajouter à celle détectée dans le cordon ombilical dès la fin du premier trimestre de grossesse chez la femme, suggérant une capacité précoce du fœtus à synthétiser et sécréter sa propre leptine (Schubring *et al.* 1997; Jaquet *et al.* 1998). De plus la présence des isoformes longues et courtes du Ob-R a été décrite, suggérant un rôle autocrine et/ou paracrine de la leptine placentaire (Ashworth *et al.* 2000).

3.3.6. Développement néonatal

A la naissance, le taux de leptine maternelle s'effondre, résultant en partie de la disparition du placenta suite à la délivrance, ce qui représente un signal pour le passage du stade fœtal au stade nouveau-né, tant pour l'adaptation de la prise alimentaire du jeune que pour sa composition corporelle (Mostyn *et al.* 2001).

Selon les espèces, le déclin du taux de leptine chez le nouveau-né, est suivi d'un pic de leptine d'amplitude et de durée variables. Ce pic se manifeste par une élévation rapide et transitoire des niveaux de leptine circulante du jeune qui vont être maintenus à une concentration élevée pendant quelques temps, par exemple de 2 à 7 jours chez le souriceau (Devaskar *et al.* 1997) et de 4 à 14 jours chez le raton (Delahaye *et al.* 2008). Cette augmentation s'explique par une synthèse plus importante de leptine au niveau du tissu adipeux du jeune et par l'absorption de la leptine contenue dans le lait (Casabiell *et al.* 1997; Ahima *et al.* 1998). La signification

biologique de ce pic de leptine est longtemps restée obscure puisque qu'il semble que la leptine ne puisse pas réguler la prise alimentaire chez le nouveau-né (Proulx *et al.* 2002). C'est grâce à la mise en évidence du rôle de la leptine dans le développement hypothalamique et son importance au niveau de la maturation du système neuronal du contrôle de la prise alimentaire qu'une des fonctions de ce pic de leptine néonatal a pu être comprise (Bouret 2010). De plus l'implication de la leptine et de ses récepteurs au niveau du tractus gastro-intestinal (Wolinski *et al.* 2003) soutien l'hypothèse d'un rôle de cette cytokine dans la préparation de la transition alimentaire au sevrage. Un rôle de la leptine dans l'organogénèse a également été décrit lors de la maturation des organes chez le porcelet (Attig *et al.* 2013).

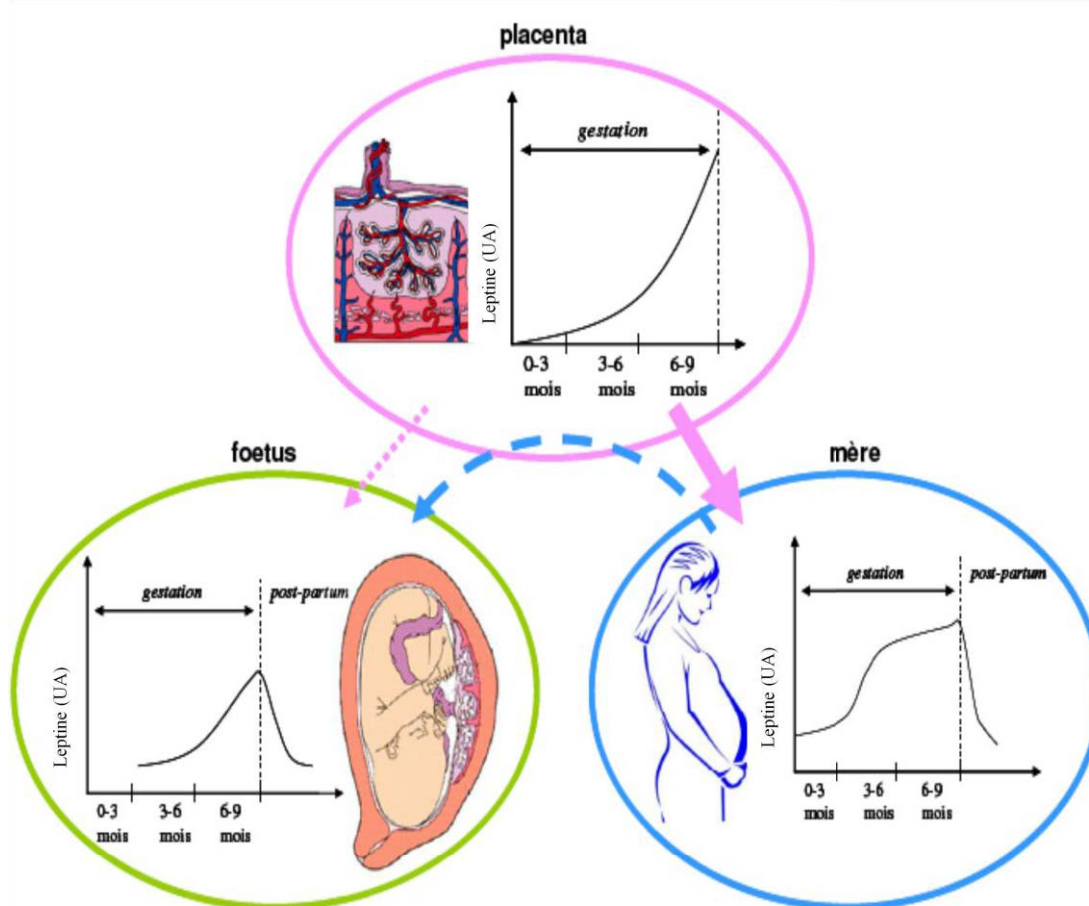


Figure 12 : Leptine et échanges fœto-maternels

Représentation schématique des échanges de leptine (proportionnels à l'épaisseur et au style des flèches) au cours du développement chez la mère, le placenta et le fœtus. La leptine placentaire diffuse

largement vers la circulation maternelle mais très peu dans la circulation fœtale. Il existe un passage transplacentaire de la leptine maternelle en direction du fœtus (d'après Attig L.,Thèse, 2008).

3.4. Dialogues endocriniens

L'état nutritionnel ou physiologique de l'individu, sa masse corporelle, son statut hormonal ou les conditions environnementales sont autant de facteurs influençant la sécrétion de leptine (Ahima & Flier 2000). L'expression de la leptine étant contrôlée par des facteurs aussi nombreux que variables, nous n'aborderons dans ce chapitre que certains d'entre eux, également impliqués dans le développement de la glande mammaire.

3.4.1. Leptine et insuline

Nous avons vu que la leptine est capable d'interférer avec l'insuline au niveau de leurs voies de signalisation respectives : la leptine influe sur les molécules IRS-1 et IRS-2 mimant ainsi une action insulinique. Inversement, une stimulation de la transcription des messagers de la leptine par l'insuline a été décrite (Leroy *et al.* 1996; Lee *et al.* 2007).

La leptine et l'insuline peuvent être considérées comme des signaux permettant de réguler la balance énergétique. En effet si la leptine est un facteur de satiété dont le taux plasmatique est corrélé au niveau de masse adipeuse de l'organisme, l'insuline plasmatique a pour rôle principal de contrôler le taux de glucose sanguin qui peut également refléter le taux d'adiposité de l'organisme. De plus une diminution des taux de leptine et d'insuline est observée en période de jeûne (Ahima & Flier 2000). Par ailleurs, la leptine étant produite localement par la glande mammaire et l'insuline pouvant augmenter le taux d'ARNm de la leptine dans les cellules épithéliales mammaires, il semble plausible que des gains de poids rapides puissent accélérer la synthèse de leptine dans la glande mammaire (Smith & Sheffield 2002).

3.4.2. Leptine et corticoïdes

La sécrétion de leptine peut être modulée par les glucocorticoïdes. En effet, la production de leptine par les adipocytes est stimulée par les glucocorticoïdes, de même que sa sécrétion adipocytaire (Masuzaki *et al.* 1997; Lee *et al.* 2007). L'adrénocorticotrophine (ACTH) sécrétée par l'hypophyse stimule la sécrétion de glucocorticoïdes par les glandes surrénales, mais inhibe la sécrétion de leptine (Gaillard *et al.* 2000). Chez la souris, l'administration de leptine réduit l'augmentation de l'ACTH et de la corticostérone induites lors d'une situation de jeûne. La leptine aurait donc un rôle de régulateur négatif de l'axe corticotrope, via une diminution du Neuropeptide Y (NPY), lui-même stimulateur de cet axe (Heiman *et al.* 1997). D'autres travaux cependant mettent en évidence une régulation directe de la stéroïdogénèse qui inhiberait ainsi la production de cortisol (Bornstein *et al.* 1997).

3.4.3. Leptine et adiponectine

L'adiponectine est également une hormone sécrétée par le tissu adipeux, mais contrairement à la leptine, chez un individu normal, sa concentration plasmatique est inversement proportionnelle aux niveaux de masse adipeuse de l'organisme et est réduite par le jeûne. Chez des rongeurs, l'injection d'adiponectine par voie intra péritonéale induit une diminution de la masse corporelle ainsi qu'une stimulation de la dépense énergétique, mais sans modifier la prise alimentaire (Fruebis *et al.* 2001).

3.4.4. Leptine et prolactine

La leptine et la prolactine semblent agir à travers des voies communes de signalisation, ce qui peut conduire à l'hypothèse d'une relation fonctionnelle entre ces deux hormones, à travers des tissus tels que la glande mammaire. Des travaux effectués au niveau de lignées de cellules épithéliales mammaires de souris montrent que la leptine et la PRL peuvent agir en synergie pour stimuler la synthèse de protéines impliquées dans la différenciation mammaire et également sur celle des protéines du lait (Motta 2004). Dans des cultures primaires de glande mammaire bovine, la leptine régule positivement les effets lactogènes de la PRL (Feuermann

et al., 2006; Feuermann *et al.*, 2008). Toutefois des travaux récents, utilisant des souris chez lesquelles le gène codant le récepteur de la PRL a été inactivé, suggèrent une absence d'interaction entre les deux hormones (Carre *et al.* 2014).

3.4.5. Leptine et Neuropeptide Y

Le neuropeptide Y a été découvert par Tatemoto en 1982 et reste très conservé à travers le règne animal (Tatemoto 1982). On retrouve le NPY dans les neurones du système nerveux central et périphérique, dans le sang, ainsi que dans de nombreux organes. Synthétisé dans le noyau arqué de l'hypothalamus, le NPY est un puissant orexigène (Kohno & Yada 2012). L'augmentation d'insuline dans le sang stimule la sécrétion de leptine ; la leptine agit sur l'hypothalamus en inhibant la production de NPY, entraînant ainsi l'inhibition de la prise alimentaire chez l'individu. Inversement, la diminution des taux de leptine et d'insuline dans le sang, induit la sécrétion de NPY par l'hypothalamus et stimule ainsi la prise alimentaire (Kohno & Yada 2012).

3.4.6. Leptine et Pro-opiomélanocortine

Sous l'action de la leptine on observe une surexpression de la pro-opiomélanocortine (POMC) hypothalamique, précurseur de l'hormone α -melanocyte-stimulating-hormone (α -MSH) qui est impliquée dans le processus d'inhibition de la prise alimentaire.

3.5. Cas particulier de la production de leptine par la glande mammaire

Pendant toutes les périodes de développement de la glande mammaire, de la vie fœtale à la vie adulte, l'épithélium mammaire se trouve adjacent à un stroma, constitué de tissu adipeux et de fibres (Neville *et al.* 1998). On sait aujourd'hui que cette matrice stromale interagit avec les cellules épithéliales et représente une source importante de facteurs impliqués dans la croissance et la morphogénèse mammaires (Levine & Stockdale 1984; Hovey *et al.* 1999; Wiesen *et al.* 1999; Zangani *et al.* 1999). Les facteurs de croissance sécrétés localement seraient notamment impliqués dans les interactions entre les adipocytes et les cellules

épithéliales mammaires, en régulant la synthèse et la sécrétion de peptides et stéroïdes et en participant ainsi à une boucle de régulation complexe. Parmi les signaux paracrines responsables de ces interactions, la leptine apparaît aujourd'hui être l'un des candidats majeurs. En effet, en utilisant le modèle de souris déficientes en leptine (*ob/ob*) qui sont stériles, l'équipe de Mounzih a montré que le traitement par la leptine exogène débuté avant l'accouplement restaure la fertilité de ces souris. Ce traitement maintenu sur différentes fenêtres temporelles de la gestation ne restaure toutefois pas la lactation, suggérant ainsi l'existence de fenêtres critiques de sensibilité à la leptine au cours du développement de la glande mammaire qui vont conditionner le fonctionnement à long terme de l'organe (Mounzih *et al.*, 1998). De plus, l'Ob-R est exprimé au niveau des cellules épithéliales mammaires (Aoki *et al.* 1999; Laud *et al.* 1999; Bonnet *et al.* 2002b; Sayed-Ahmed *et al.* 2004; Lin Y 2007; Wang *et al.* 2011), ce qui évoque un rôle paracrine de la leptine sur la croissance, le développement et la fonction mammaires. En particulier, la synthèse de leptine par les adipocytes mammaires en début de gestation, suggère un rôle paracrine de cette hormone dans la prolifération et la différenciation des CEM. La croissance et le développement mammaires pendant la gestation sont dépendants d'hormones, notamment stéroïdes, dérivées des ovaires, du placenta et de l'hypophyse. Cependant, plusieurs travaux réalisés *in vitro* indiquent que ces effets hormonaux seraient indirects et médiés par des facteurs de croissance synthétisés par les adipocytes mammaires (Levine & Stockdale 1984; Rudland *et al.* 1984; Woodward *et al.* 1998). La leptine pourrait ainsi jouer le rôle d'un de ces facteurs paracrines stéroïdo-dépendants sécrétés par les adipocytes mammaires.

Chez les ovins, l'expression de la leptine et de son récepteur dans la glande mammaire, varie considérablement au cours de la gestation et de la lactation. La synthèse de leptine est ainsi maximale durant la première moitié de la gestation (Bonnet *et al.* 2002b) et celle de son récepteur pendant le deuxième tiers (Laud *et al.* 1999). La leptine est détectée au niveau des adipocytes pendant les premiers stades de la gestation, puis dans les cellules épithéliales en fin de gestation et, enfin, dans les cellules myoépithéliales pendant la lactation. L'expression de la leptine dans la glande mammaire, décroît fortement au moment de la parturition et reste très faible pendant la lactation. Chez les souris, le niveau sérique de leptine à mi-lactation et en fin de lactation ne sont pas significativement différents de celui d'une souris non gestante (Aoki *et al.* 1999). Chez les ruminants, la forte expression mammaire du gène de la leptine à mi-gestation coïncide tout à fait avec l'augmentation plasmatique de la concentration en œstradiol. A la fin de la gestation, le tissu adipeux mammaire a complètement régressé mais la

synthèse de leptine continue localement dans les cellules épithéliales, quoique beaucoup plus faiblement que dans des adipocytes. Si cette prise de relais n'est pas encore très bien comprise dans son mécanisme, elle permet d'expliquer la présence de leptine dans le colostrum et le lait (Pinotti & Rosi 2006). Les effets prolifératifs de la leptine sur la glande mammaire ont été bien documentés, aussi bien sur des cultures de cellules mammaires bovines (Purup *et al.* 2000), que sur des lignées mammaires tumorales humaines T47D et MCF-7. Dans ces modèles, la leptine est capable d'induire l'activité des MAPK (Dieudonne *et al.* 2002; Laud *et al.* 2002).

Chez les rongeurs, la leptine est fortement exprimée dans la glande mammaire de rate vierge. Puis cette synthèse décroît graduellement durant la gestation, ce phénomène étant probablement dû à la régression du tissu adipeux au profit du tissu épithélial. Pendant la lactation cette synthèse est augmentée (Wang *et al.* 2011). Chez la souris, une caractérisation de la leptine et de ses récepteurs a été réalisée sur des explants en culture à différents stades de gestation, lactation et involution. Une corrélation positive entre l'expression de la protéine et celle du récepteur a pu être mise en évidence. L'expression maximale de la leptine a été observée aux stades où le tissu adipeux représente une part importante du tissu mammaire, tels que l'état vierge ou l'involution (Lin 2007). Dans l'espèce humaine, Smith-Kirwin *et al.* ont montré que la leptine est produite par l'épithélium de la glande mammaire de femmes allaitantes (Smith-Kirwin *et al.*, 1998).

3.5.1. Présence de la leptine dans le lait

Des études ont montré que la leptine maternelle circulante peut être transférée dans le lait et ainsi se retrouver dans la circulation sanguine du nouveau-né (Casabiell *et al.*, 1997). La présence de leptine dans le lait peut être expliquée par deux mécanismes : le transfert de leptine du compartiment sanguin maternel vers le lait et la synthèse locale de leptine au niveau de la cellule épithéliale mammaire. Des études menées chez la femme ont montré que la concentration de leptine dans le lait varie fortement durant la lactation et peut être corrélée à la leptinémie maternelle (Ilcol *et al.* 2006). De même, chez la rate, la leptine maternelle durant la lactation et celle contenu dans le lait sont dépendantes de l'état nutritionnel de la mère durant la gestation (Wattez *et al.* 2014). Cependant même si la concentration de leptine dans le lait reflète indirectement l'adiposité maternelle, elle n'est pas pour autant un

indicateur de l'adiposité du jeune consommant ce lait (Houseknecht *et al.* 1997; Uysal *et al.* 2002). Les concentrations de leptine dans le lait sont plus élevées dans le lait entier que dans le lait écrémé, très probablement du fait de l'association de la leptine avec les globules lipidiques (Houseknecht *et al.* 1997).

La leptine absorbée par le jeune au travers de sa consommation de lait maternel est directement absorbée par l'épithélium gastrique immature et produit des effets biologiques, durant la période néonatale, tels que la régulation négative de la production de leptine endogène ou encore le contrôle à court terme de la prise alimentaire, via le centre de contrôle hypothalamique (Pico *et al.*, 2007b ; Casabiell *et al.*, 1997). Chez l'homme une corrélation négative a été montrée entre les concentrations de leptine dans le lait et le gain de poids pendant l'enfance, attribuant à la leptine contenue dans le lait maternel un rôle protecteur contre l'obésité à l'âge adulte (Uysal *et al.* 2002). Ces résultats doivent être considérés avec prudence car la leptine reste un échec clinique, en tant que traitement contre l'obésité, comme le témoigne le retrait de marché de médicaments anti-obésité à base de leptine ou de ses analogues comme par exemple la Sibutramine, ou le Sibutral®.

3.5.2. Rôle du lait dans la programmation métabolique

Chez les mammifères, le lait représente une première interaction forte entre le nouveau-né et son environnement. Alan Lucas a émis l'hypothèse qu'un certain nombre de facteurs environnementaux, en particulier l'alimentation, pouvaient interférer précocement avec le développement de l'individu et le prédisposer à l'apparition de pathologies à l'âge adulte, développant ainsi le premier concept de programmation (Lucas 1991). Plus précisément, la notion de programmation métabolique soutient une origine précoce au développement des maladies liées au syndrome métabolique à savoir l'obésité, le diabète de type 2, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (pour revue, voir McMillen *et al.*, 2005). Un des aspects fondamentaux de ce concept repose sur la notion de fenêtres temporelles critiques, généralement bien délimitées dans le temps, durant lesquelles ces perturbations vont interférer avec le développement de l'organisme. C'est notamment au cours des périodes de la vie fœtale et post-natale précoce, périodes pendant lesquelles la plasticité de l'individu est maximale que les effets à long terme des conditions environnementales pourront particulièrement s'exercer.

Le rôle de la leptine est important dans la mise en place de la régulation centrale du comportement alimentaire qui se réalise au cours du développement fœtal et/ou la période périnatale. Il a été montré en particulier que la leptine exerce une action neurotrophique responsable de l'établissement des réseaux neuronaux hypothalamiques qui détermineront d'une manière pérenne le comportement alimentaire de l'individu. En effet, la leptine fournie *per os* à des rats nouveau-nés est directement captée par l'estomac immature et semble réguler la prise alimentaire à court terme (Sanchez *et al.* 2005). De plus, chez la souris, l'administration de leptine durant la période néonatale conduit au développement d'une intolérance au glucose chez la descendance adulte ; ces effets ont été observés sur la descendance mâle et sont dépendants du statut nutritionnel de la mère (Vickers *et al.* 2008). Dans la même perspective, le blocage de l'action de la leptine par l'administration d'antagonistes spécifiques, à des rats nouveau-nés provoque une dérégulation à long terme de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques qui conduit ultérieurement à une susceptibilité accrue à l'obésité (Yura *et al.* 2005).

Le retard de croissance intra-utérin, qui conduit à un petit poids de naissance, constitue également une situation qui prédispose au développement du syndrome métabolique et de l'obésité à l'âge adulte. Des travaux réalisés chez le rat, montrent qu'une dénutrition maternelle conduit à une diminution du poids de naissance, de la leptine sérique et de certains de ses relais centraux chez les petits mais ne suffit pas à engendrer des modifications sévères de la régulation pondérale (Delahaye *et al.* 2008). En utilisant le porcelet comme modèle animal, il a été montré que les nouveau-nés RCIU présentent une immaturité du développement hypothalamique en terme de localisation des récepteurs de la leptine. Dans cette espèce, l'administration de leptine pendant les dix premiers jours de vie permet de stimuler la croissance et de parfaire la maturation de certains organes impliqués dans la régulation métabolique (Attig *et al.* 2010).

Les protéines bioactives, telles que la leptine, retrouvées dans le lait à des concentrations variables, dans le temps et d'une espèce à l'autre, sont donc des éléments essentiels à une bonne programmation métabolique pour le jeune et l'adulte qu'il deviendra. Les recherches actuelles s'étoffent pour comprendre précisément ces actions à long terme. Les observations issues de ces travaux ont donné naissance au concept de « programmation périnatale » couramment utilisé sous l'acronyme DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease).

OBJECTIFS DE LA THESE

De plus en plus d'études montrent que chez la femme, la qualité du lait maternel induit non seulement des effets immédiats sur la santé du jeune, mais possède également une incidence à long terme sur la prévention de maladies à l'âge adulte (Savino *et al.* 2013). Toutefois, l'allaitement peut être entravé par l'obésité, dans la mesure où cette dernière compromet à la fois la mise en œuvre et la durée de la lactation. Ainsi l'alimentation est l'un des facteurs essentiels qui conditionnent à la fois le développement de la glande mammaire et la composition du lait. Par voie de conséquence, une alimentation inadaptée, peut induire des effets à plus ou moins long terme qui pourraient se répercuter sur la génération suivante. Une telle transmission a déjà été décrite en cancérologie.

Notre laboratoire avait montré l'influence de l'obésité, induite par la consommation régulière d'un régime riche en sucres et en graisses, depuis la puberté, sur le développement de la glande mammaire à mi-gestation chez la lapine (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Le travail de thèse présenté dans ce mémoire, soulève des questions complémentaires majeures, telles que l'existence de fenêtres critiques de sensibilité à l'alimentation, autres que la puberté et s'intéresse également aux mécanismes cellulaires sous-jacents à l'altération du développement mammaire, qui étaient peu documentés. Dans cette perspective, mon travail de thèse a poursuivi un triple objectif.

OBJECTIF 1 :

Nous avons évoqué lors de l'introduction générale le lien entre l'adiposité d'un individu, le taux de leptine circulant ainsi que les effets induits par cette protéine sur le développement mammaire. La production de leptine mammaire a déjà été décrite chez les ruminants et les souris mais les effets directs de la leptine sur le développement d'une glande mammaire non tumorale n'ont été que rarement décrits. Nous avons choisi le lapin comme modèle d'étude pour répondre à ces questions (cf. matériel & méthodes 1.CHOIX DES MODELES ANIMAUX). Dans un premier temps, nous avons caractérisé le développement mammaire chez cette espèce et nous avons décrit le développement de la glande mammaire de lapine à différents stades physiologiques et étudié l'expression et la localisation de la leptine cet organe au cours de la gestation et la lactation.

Nous avons ainsi montré que la production mammaire de leptine chez la lapine est peu élevée durant la gestation, puis augmente en début de lactation pour atteindre son expression maximale à mi-lactation (Publication 1).

OBJECTIF 2 :

Dans un deuxième temps, nous nous sommes proposés d'étendre au stade néonatal la fenêtre nutritionnelle pendant laquelle les régimes alimentaires utilisés précédemment (Hue-Beauvais *et al.* 2011) sont distribués et d'étudier le rôle de la leptine dans les phénotypes mammaires induits par cette alimentation.

- ❖ Nous avons étendu la fenêtre nutritionnelle à la période néonatale en étudiant les effets combinés d'un allaitement par une mère nourrie avec un régime obésogène, suivi de l'administration de ce même régime, avant la puberté. Afin de pouvoir dissocier l'impact des effets de l'alimentation néonatale via l'allaitement, de ceux *in utero*, nous n'avons pris en compte que la descendance des mères alimentées avec un régime témoin.

Les résultats obtenus lors de notre étude, sur le modèle lapin, ont montré que les effets de l'allaitement par un lait issu de mère hyperadipeuse potentialisent ceux d'un régime obésogène et induisent un développement mammaire anormal observé dès les stades précoces de la gestation chez les descendants (Publication 2)

- ❖ Nous avons étudié *ex vivo*, les variations de voies de signalisation de la leptine lors de cultures primaires d'organoïdes mammaires prélevés chez des lapines nourries avec un régime obésogène dès la puberté et nous les avons comparées à celles d'animaux témoins.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence la synthèse et la sécrétion locale de leptine par les cellules mammaires en culture et l'activité de cette protéine dans un modèle cellulaire hétérologue.

OBJECTIF 3 :

Nous avons vu dans l'introduction générale qu'une même cause pouvait engendrer des effets divers selon les espèces. Afin de pouvoir replacer nos travaux au sein de ceux décrits par la communauté scientifique internationale, nous avons souhaité évaluer la variabilité inter et intra espèces, des effets mammaires induits par notre modèle d'alimentation obésogène. Nous avons pour cela choisi la souris comme modèle d'étude (cf. matériel & méthodes 1. CHOIX DES MODELES ANIMAUX). Nous avons caractérisé les effets d'un régime équivalent à celui donné aux lapines, administré dès la puberté sur le développement mammaire à mi-gestation chez la souris. Par ailleurs, comme au sein d'une même espèce animale les réponses, suite à des variations physiologiques, varient selon les souches, nous avons développé ce modèle nutritionnel chez deux souches murines, la souche FVB/N et la souche C57BL/6. De cette manière, nous avons pu évaluer la variation intra espèce due au fond génétique et également les paramètres de croissance selon deux fenêtres nutritionnelles : alimentation obésogène administrée à partir de la puberté ou dès la période néonatale.

MATERIEL & METHODES

1. CHOIX DES MODELES ANIMAUX

Les expérimentations faites dans le cadre de cette thèse ont été réalisées dans le respect des normes en vigueur décrites dans le document : « International guiding principles for biomedical research involving animals » publiées par la « Society for the study of reproduction » et également en accord avec le « European community regulation of animal experimentation » (Directive 86/609/EEC). Les personnes ayant pris part à ces expérimentations sont titulaires d'autorisations délivrées par les services vétérinaires (bautorisation 78-119). Les protocoles expérimentaux ont tous fait l'objet de saisines, approuvées par le comité scientifique et éthique local (n°45 Comethea) et accréditées par le Ministère de l'Enseignement, de la Santé et de la Recherche.

1.1. Le modèle lapin :

Le lapin est depuis longtemps considéré dans le monde scientifique comme un modèle biomédical de choix. Cet animal présente en effet les avantages d'être prolifique et de pouvoir être élevé dans des conditions bien maîtrisées, conditions indispensables pour en faire un animal de laboratoire. Sa taille permet d'effectuer des manipulations trop délicates sur les souris et les rats et d'obtenir d'une quantité plus importante de matériel biologique. De plus, c'est un modèle approprié pour étudier l'hypertension et l'athérosclérose car son métabolisme lipidique est plus proche de l'homme que celui de la souris et se révèle très sensible à l'induction d'une hyperlipidémie par l'alimentation (Kouba & Mourot 2011).

La placentation de la lapine est du même type que celle de la femme, à savoir hémochoriale et sa gestation relativement courte, allie le double avantage de pouvoir y définir des fenêtres temporelles bien établies et d'avoir un temps de génération relativement court. Nous avons évoqué lors de l'introduction générale le développement mammaire de la lapine en lactation (Lu & Anderson 1973). Les petits têtent une fois par jour, ce qui permet d'évaluer facilement la production laitière et la consommation des lapereaux, par pesées de la mère ou/et des petits avant et après allaitement.

Le lapin néo-zélandais est de taille moyenne par rapport aux autres lignées de lapins. Il pèse entre 4 et 5,5 kg. Il a un corps massif caractérisé par une très forte conformation musculaire. Il

n'est pas très long et a la croupe bien large. Ses pattes sont courtes et fortes. Sa tête est volumineuse avec des mâchoires bien développées, et se confond avec le tronc. Les yeux sont roses, autre caractéristique de l'albinisme, la fourrure entièrement blanche est très dense, souple et lustrée. Cette race est sélectionnée sur la vitesse de croissance et son développement musculaire. Le lapin néo-zélandais se montre bien adapté à la vie sur grillage et ses qualités de producteur de viande en ont fait un animal très utilisé pour la constitution d'hybrides hyperproductifs utilisés en élevage industriel. La souche INRA1077 a été sélectionnée pour ses femelles qui transmettent une aptitude à assurer une bonne survie et une bonne croissance des lapereaux, de la fécondation jusqu'au sevrage (D'après Rochambeau 1994 *L'amélioration génétique du lapin en France : description et bilan*. CR Académie d'agriculture, F2, 80(4), 13-22.)

Ce modèle animal apparaît donc tout à fait pertinent et adapté aux programmes de recherche menés dans le laboratoire dont les objectifs sont une meilleure connaissance du développement mammaire dans des conditions d'alimentation altérée. Cependant le principal inconvénient pour l'utilisation du lapin comme modèle expérimental est sa fragilité notoire qui se manifeste par une susceptibilité accrue aux maladies aussi bien au sevrage qu'à l'âge adulte (diarrhées, affection respiratoires, Pasteurellose, ...).

1.2. Le modèle souris :

Nous avons choisi de transposer notre étude chez la souris de laboratoire (*Mus musculus*) car cette espèce joue aujourd'hui un rôle très important dans la recherche biomédicale. La souris s'est imposée comme modèle majeur en raison de certains intérêts aussi bien pratiques que fondamentaux : faibles coûts, cycle de reproduction court, croissance rapide, facilité de transport, facilité de manipulation et une très bonne adaptation aux conditions expérimentales. De plus, la présence de gènes équivalents chez l'Homme et la souris (plus de 90% de gènes homologues) ainsi que la facilité de modification de son génome font de cette espèce un outil indispensable dans la recherche. Toutefois, sa physiologie est relativement éloignée de celle de l'espèce humaine, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre concernant les spécificités de la glande mammaire de souris. Dans le contexte de notre projet scientifique, l'intérêt de l'utilisation du modèle murin repose également sur la nécessité d'approches technologiques

telles que la biopsie mammaire, la transplantation de cellules mammaires, l'utilisation d'animaux naturellement mutants ou encore la transgénèse inductible et/ou conditionnelle.

Nous avons décidé d'utiliser deux souches de souris : la souche FVB/N car très utilisée en transgénèse, elle fournit un outil précieux une fois que le phénotype mammaire induit par le régime obésogène est caractérisé. Nous avons également utilisé la souche C57Bl/6, connue pour avoir de faibles rendements de reproduction et d'allaitement, mais qui permet d'évaluer l'impact de notre modèle dans des conditions moins favorables et de replacer nos travaux au sein d'un contexte international (Ewart-Toland *et al.* 1999).

En 1970 la souche FVB/N a été obtenue par croisements consanguins de souris homozygotes pour l'allèle Fv1b qui induit une sensibilité à la souche B du virus de la leucémie de Friend. La présence d'un pronucleus de grande taille dans les embryons qui facilite la micro-injection et la taille des portées, font de la souche FVB/N une lignée de choix pour la transgénèse. La souris FVB/N, de pelage blanc est très active et développe une faible hyperthermie lors de stress. Elle ne développe pas de tumeur spontanée et présente une certaine résistance à l'induction chimique des papillomes qui, en cas d'apparition, évoluent la plupart du temps en carcinomes. Les paramètres physiologiques de cette lignée sont largement documentés. Le taux de stérilité est faible (10%) et la durée de la gestation est de 18 à 20 jours pour des tailles de portées de 7 à 8 souriceaux en moyenne (D'après <http://www.janvier-labs.com>).

La souche C57BL/6 également utilisée lors de notre étude, a été développée en 1921 et la colonie du Jackson Laboratory a été subdivisée en deux sous-lignées avant 1937, donnant ainsi les souches C57BL/6 et C57BL/10. La souche C57BL/6 a été introduite au Jackson Laboratory en 1948 sous le nom de C57BL/6J. C'est une lignée communément utilisée puisqu'elle est la première dont la séquence du génome a été décryptée. Elle reste peu sensible aux tumeurs spontanées, mais permet l'expression d'un grand nombre de mutations, d'où son utilisation fréquente comme fond génétique des modèles transgéniques. Cette souche de pelage noir et de petit gabarit est sensible aux régimes alimentaires d'induction au diabète de type 2 et à l'athérosclérose. Une alopecie caractéristique de la souche, est attribuée à des phénomènes comportementaux de type « overgrooming/barbering » (JAX® Notes, 1987, Sundberg *et al.*, 2011) ou à un comportement anormal de type TOC (Gamer *et al.*, 2004). La souche que nous avons utilisée est la souche C57BL/6J. Cette souche est caractérisée par une hydrocéphalie héréditaire, la présence d'une cloison vaginale à 24-28 jours, une faible densité

osseuse, un taux élevé d'anomalies oculaires ainsi qu'une addiction à la morphine et à l'alcool. Ses paramètres de reproduction sont bons puisque le taux de stérilité est de 5%, la durée de gestation est de 18 à 20 jours pour un nombre de petits moyen par portée de 5. Les femelles allaitent leurs petits malgré un taux de cannibalisme pouvant être important en fonction de son stress. La souris C57BL/6J est un animal actif et assez agressif mais facile à manipuler et ayant une longue espérance de vie (2 ans).

2. MODELES *IN VIVO* ET *IN VITRO*

2.1. Lapins

Pour l'ensemble des études nous avons utilisé des lapines néo-zélandaises de la souche INRA1077.

2.1.1. Régimes

Le régime utilisé pour l'étude des effets de l'alimentation chez les lapins est décrit dans la publication Hue-Beauvais *et al*, 2011, jointe en annexe. Ce régime obésogène (OB) est enrichi en acides gras saturés (saindoux + 276%) et en sucres (+269%) par rapport au régime témoin (T).

2.1.2. Cohortes

Les protocoles d'expérimentation utilisés dans le cadre de cette thèse sont décrits dans les publications 1 et 2 et les tableaux de synthèse des animaux utilisés sont représentés dans la figure 13.

L'analyse de la composition corporelle a été réalisée à 6 mois d'âge chez les mâles et à 7 mois d'âge chez les femelles. Le groupe de mâles allaités par un lait Ob et nourris après le sevrage avec le régime OB (OB/OB) n'a pas pu être analysé en raison de problèmes expérimentaux.

Pour l'étude des voies de signalisation de la leptine dans des modèles de cultures primaires d'organoïdes mammaires, les lapines ont été alimentées dès la puberté, avec un régime témoin (lapines T) ou un régime obésogène (lapines OB) dont la composition et les effets sur la glande mammaire ont été décrits précédemment (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Les lapines T et OB ont été accouplées à l'âge de 16 semaines et euthanasiées au 11^{ème} jour de gestation (G11). La glande mammaire de chaque lapine a été disséquée en éliminant les fibres musculaires et le tissu conjonctif, afin de ne garder que le tissu épithélial. Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois.

Lait de nourrices	Régime à partir de 7 semaines	Dénomination du groupe	Sexe
T (n=24)	T	T/T (n=13)	F (n=8)
			M (n=5)
	OB	T/ OB (n=11)	F (n=5)
			M (n=6)
OB (n=26)	T	OB/T (n=14)	F (n=6)
			M (n=8)
	OB	OB /OB (n=12)	F (n=6)
			M (n=6)

Figure 13 : Description des cohortes de lapins utilisés pour l'étude des effets combinés d'un lait issu de femelles nourries avec un régime témoin ou obésogène et d'une alimentation témoin ou obésogène, sur la croissance

2.2. Souris

2.2.1. Régimes

Ce modèle nutritionnel est basé sur des données humaines obtenues pour des adolescentes ou des jeunes femmes en âge de se reproduire qui dérèglent leur alimentation par une consommation excessive de gras et de sucre. Dans le modèle murin, nous avons utilisé un

régime commercial, préalablement décrit pour avoir un effet obésogène sur différentes souches de souris (Parks *et al.* 2013).

Nous avons choisi un régime hypergras et hypersucré, appelé régime obésogène (OB), afin de créer un modèle de souris équivalent au modèle lapin. Ce régime contient une très grande proportion de graisses, essentiellement des acides gras saturés et un fort taux de carbohydrates à fort pouvoir obésogène, tels que le sucrose ou la maltodextrine qui a un index glycémique faible (« sucres lents ») permettant une absorption lente, contrairement au régime commercial témoin (T) dont la teneur en carbohydrates, bien que très importante par rapport au régime d'élevage habituel de l'animalerie (M25) (Special Diet Service, France), est composée essentiellement de dextrine dont le pouvoir obésogène est beaucoup plus faible en raison de leur index glycémique élevé (« sucres rapides »).

	T (%)	OB (%)	M25 (%)
INGREDIENTS			
Dextrine	42,30	20,62	x2
Sucrose	24,62	27,81	
Caséines	16,13	18,22	
AIN-76 (mélange minéral)	3,40	3,87	
Huile de maïs	3,34	11,32	x 3,4
Maltodextrine	2,97	7,19	x 2,4
Cellulose en poudre	2,55	2,88	
Matière grasse du lait	1,25	4,24	x 3,4
Citrate de Potassium	1,14	1,29	
AIN-76A (mélanges de vitamines)	0,93	1,06	
Chlorure de sodium	0,47	0,53	0,24
Carbonate de Calcium	0,48	0,49	0,48
DL-Methionine	0,25	0,28	
Choline Bitartrate	0,17	0,20	0,20
Colorant	0,01	0,01	
PROFIL NUTRITIONNEL			
Protéines	14,40	16,30	23,45
Graisses	4,50	15,40	3,00
Fibres	2,50	2,90	4,54
Sucres	71,10	56,70	50,80
Energy kcal/g	3,83	4,31	3,6

Figure 14 : Comparaison de la composition des régimes des souris

Les pourcentages sont exprimés en fonction de la matière sèche

Les différents régimes ont été administrés à partir du sevrage et pendant 70 jours avant l'accouplement. Les conditions nutritionnelles des animaux ont été maintenues durant les phases d'accouplement, de gestation et de lactation.

2.2.2. Cohortes

Deux souches de souris ont été utilisées pour ce protocole : la souche C57BL/6J (30 femelles) et la souche FVB/N (30 femelles). Les animaux ont été logés en cages individuelles. Au sein de chaque souche les animaux ont été divisés aléatoirement en 3 groupes expérimentaux : le premier groupe (n=10) a été alimenté avec un régime usuel d'élevage (groupe M25), le deuxième groupe (n=10) a reçu le régime témoin (groupe T) et le dernier (n=10) a reçu le régime obésogène (groupe OB). La moitié des animaux de la cohorte 1 (Figure 15) a subi une superovulation permettant de synchroniser les gestations et de réaliser des biopsies mammaires à mi-gestation. Ces biopsies une fois réalisées ne permettent plus le prélèvement de lait, pour cette raison, la seconde moitié des souris a été accouplée naturellement afin de pouvoir mesurer les paramètres de reproduction dans des conditions physiologiques normales et réaliser des prélèvements de lait.

Dans chaque groupe expérimental, la moitié des animaux (n=5) a été accouplée naturellement pendant 18 heures avec un mâle de la même souche et les bouchons vaginaux ont été relevés afin de déterminer des gestations potentielles. L'autre moitié a été synchronisée à l'aide d'une superovulation provoquée par deux injections péritonéales consécutives à 48h d'intervalle de gonadotrophine extraite du sérum de jument gravide (PMSG) et de gonadotrophine chorionique humaine (hCG) à raison de 5UI/souris chacune (Luo *et al.* 2011). Les souris ont été accouplées juste après la seconde injection et à l'instar des accouplements naturels, les bouchons vaginaux ont été relevés. Les gestations ont été menées jusqu'au terme.

Les animaux de la cohorte 2 (Figure 16), correspondent aux souriceaux issus de mères ayant ingéré le régime T ou OB. Ces souriceaux ont été répartis de manière aléatoire sous les mères-nourrices alimentées avec le régime T ou OB, tout en veillant à équilibrer les portées de sorte à avoir 6 souriceaux sous chaque mère. Après sevrage, les femelles et les mâles ont été sexés, séparés et mis sous alimentation OB pendant 70 jours avant d'être accouplés. Ces animaux,

ont ainsi reçu différenciellement un lait T ou un lait OB à la naissance, puis ont été alimentés après le sevrage uniquement avec le régime OB, pour deux raisons : d'une part, parce que le modèle lapin nous a montré que le lait potentialisait l'effet du régime uniquement dans le cas d'un régime obésogène et, d'autre part, parce que les effets du régime T sur le développement mammaire avaient déjà été évalués avec les souris de la cohorte 1. Enfin, nous ne disposions pas d'un nombre suffisant d'animaux pour étudier toutes les variables nutritionnelles (effets *in utero*, lait et régime) et notre choix s'est porté sur la variable « lait ».

L'accouplement des souris de la cohorte 2 a été réalisé après superovulation afin de permettre la synchronisation des expériences. Les animaux gestants ont ensuite été sacrifiés à mi-gestation (12 jours de gestation), stade auquel les effets du régime sur le développement mammaire avaient été caractérisés chez le lapin.

Souche	Régime	Accouplement	Biopsie mammaire G12.5	Prélèvement de lait L10
FVB/N	M25 (n=10)	Naturel (n=5)	Non	Oui
		Superov (n=5)	Oui	Non
	T (n=10)	Naturel (n=5)	Non	Oui
		Superov (n=5)	Oui	Non
	OB (n=10)	Naturel (n=5)	Non	Oui
		Superov (n=5)	oui	Non
C57BL/6	M25 (n=10)	Naturel (n=5)	Non	Oui
		Superov (n=5)	Oui	Non
	T (n=10)	Naturel (n=5)	Non	Oui
		Superov (n=5)	Oui	Non
	OB (n=10)	Naturel (n=5)	Non	Oui
		Superov (n=5)	Oui	Non

Figure 15 : Description des cohortes de souris alimentées avec les différents régimes depuis la puberté (cohorte 1)

Souche	Régime de la mère biologique	Lait de nourrices	Régime à partir de 4 semaines	Dénomination du groupe	Sexe	Nombre de souris par sous- groupe
FVB/N	M25	M25	M25	M25/M25/M25	F	5
					M	4
	T	T	OB	T/T/OB	F	7
					M	9
		OB	OB	T/OB/OB	F	8
					M	6
	OB	T	OB	OB/T/OB	F	3
					M	6
		OB	OB	OB/OB/OB	F	10
					M	6
C57Bl/6	M25	M25	M25	M25/M25/M25	F	6
					M	5
	T	T	OB	T/T/OB	F	0
					M	3
		OB	OB	T/OB/OB	F	4
					M	0
	OB	T	OB	OB/T/OB	F	4
					M	1
		OB	OB	OB/OB/OB	F	0
					M	4
Figure 16 : Description des différents groupes de souris de la cohorte 2						

2.3. Modèles *in vitro*

Le dosage de la leptine dans le lait de lapine n'a pas encore été décrit. Nous avons tenté de mettre au point un dosage par radio-immunologie ou par immuno-détection, mais cet investissement coûteux en matériel biologique et en temps, ne nous a pas permis d'obtenir des résultats reproductibles. Nous avons donc choisi de comparer la capacité des cellules

mammaires de lapines T et OB en culture à répondre à une stimulation par la leptine en évaluant l'activation des voies de signalisation STAT3 et MAPK.

2.3.1. Cultures primaires de cellules mammaires

Pour chaque préparation, 7g de tissu mammaire ont été disséqués et dilacérés, puis digérés dans 100 ml de tampon phosphate (PBS 1X) contenant de la collagénase IV et de la hyaluronidase à raison de 200 unités/ml, destinées à dégrader la matrice extracellulaire. Le mélange a été incubé 1 heure à 37°C sous agitation (180 rpm) avant d'être canulé afin de parfaire la dissociation et filtré dans une passoire à thé pour éliminer les derniers résidus de tissu conjonctif. La digestion a ensuite été arrêtée par addition d'un même volume de Ham's/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM / Nutriment F-12 Ham, Gibco). Les suspensions d'organoïdes mammaires ainsi obtenues ont été centrifugées 5 minutes à 1500 rpm et lavées plusieurs fois. Le dernier culot a été remis en suspension dans du milieu GC3 (DMEM contenant du pyruvate à 1g/L, mélange d'acides aminés non essentiels 1X, L-glutamine 1 mM, Pénicilline 100 UI/ml, gentamycine 1µg/ml, transferrine à 10µg/ml et insuline à 2.5 µg/ml) qui permet la survie des cellules épithéliales mammaires mais qui ne contient aucun facteur susceptible de stimuler spécifiquement les voies de signalisation que nous souhaitons étudier. Après comptage, les cellules agrégées sous formes d'organoïdes ont été réparties dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (P100) à raison de 10^6 cellules par P100 dans 10 ml de milieu GC3 et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Les organoïdes peuvent être maintenus en culture durant 24 ou 48h, temps après lequel le milieu de culture, appelé milieu conditionné, est prélevé afin d'analyser les produits de sécrétion des cellules. Afin d'étudier l'activation des voies de signalisation de la leptine, ces cultures ont été stimulées par différentes leptines recombinantes (obtenues par le Pr. A. Gertler, Jerusalem, Israël). Dans ce cas, les cellules ont été grattées dans 500µl de tampon de lyse (Brij 96 1%, Tris-HCl 20mM pH8, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, glycérol 10%), contenant un cocktail commercial d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Complete EDTA-free et PhoSTOP, Roche, France). Les lysats cellulaires ont été homogénéisés pendant 30 minutes à 4°C sur une roue, puis centrifugés 20 min à 13000 rpm. La concentration en protéines de chaque échantillon a ensuite été déterminée par dosage colorimétrique en

utilisant le kit « BCA Protein assay » (Pierce, France) selon le protocole recommandé par le fabricant.

L'activation de la voie de signalisation Jak2/STAT5 induite par la stimulation courte avec la PRL a été appréciée par la détection de la forme phosphorylée de STAT5 (P-STAT5). La capacité des organoïdes à répondre à une stimulation longue de PRL a été évaluée par la synthèse de la caséine κ dont les différentes isoformes sont aisément détectables par western blot.

2.3.2. Culture de cellules rénales embryonnaires humaines HEK293T

Pour analyser une réponse spécifique à la leptine, nous avons utilisé des cellules qui sont sensibles ou non à cette cytokine grâce à la présence ou non d'un récepteur spécifique. L'intérêt de la lignée HEK293T pour nos expériences réside dans le fait qu'elle n'exprime pas l'Ob-R. Cette lignée, une fois transfectée avec l'Ob-Rb, représente donc un outil de choix pour étudier la présence éventuelle de leptine dans les milieux conditionnés issus de culture primaire d'organoïdes mammaires T ou OB.

La lignée cellulaire HEK293T, dérivée de la lignée HEK293, est une lignée de cellules embryonnaires épithéliales rénales humaines, dans laquelle est exprimé l'antigène grand T du virus simiesque SV40. Cette modification rend cette lignée beaucoup moins sensible que celle dont elle dérive vis-à-vis des conditions de culture. En particulier, elle est beaucoup plus adhérente que sa consœur et les cellules semblent moins sensibles aux conditions toxiques auxquelles elles sont exposées lors de la transfection. Ce dernier aspect permet de garantir la conservation de l'ensemble de la population cellulaire traitée jusqu'au moment de l'analyse. Enfin, il a été montré que les conditions expérimentales de culture cellulaire et de transfection définies comme optimales pour la lignée HEK293 permettant l'obtention de résultats tout aussi satisfaisants, si ce n'est plus, avec la lignée HEK293T.

Les cellules HEK293T (ATCC, LGC Standards, France) de passages précoces (p3) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant du glucose à une concentration de 1 g/l, additionné de pénicilline à 100 UI/ml, de gentamycine à 1 µg/ml,

de L-glutamine à 2 mM et de sérum de veau fœtal décomplémenté à 10%. Les cellules ont été incubées en atmosphère humide, à 37°C sous 5% de CO₂.

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec un plasmide contenant l'Ob-Rb murin couplé au gène codant le fluorochrome YFP en position C-terminale (construction réalisée au laboratoire par Madia Charlier), en utilisant comme transfectant l'ExGen 500 (Euromedex, France), selon le protocole décrit par le fournisseur. Les cellules ont été maintenues 48h dans du milieu GC3. Le taux de transfection a été estimé après 48h par microscopie photonique, dans la mesure où les cellules ayant intégré l'Ob-Rb expriment également l'YFP. Les cellules ont ensuite été stimulées, soit avec de la leptine recombinante dans du milieu GC3, soit avec les différents milieux conditionnés issus des cultures primaires d'organoïdes mammaires de lapines T ou OB. Après stimulation, les cellules ont été lysées et traitées comme décrit précédemment, dans le cas des organoïdes mammaires de lapine.

3. SUIVI DES ANIMAUX

3.1. Croissance et prise alimentaire

La taille et le poids des portées ont été mesurés à la naissance et au moment du sevrage pour les lapins comme pour les souris.

La prise de poids des lapins a été mesurée par pesée hebdomadaire. La prise alimentaire a été mesurée par pesée différentielle hebdomadaire de la ration, entre la quantité donnée et la quantité non consommée.

La prise de poids des souris a été calculée à partir du début de la mise sous régime, à 4 semaines d'âge et à une fréquence bi-hebdomadaire, pendant 70 jours, jusqu'à l'accouplement.

3.2. Composition corporelle des lapins

L'absorptiométrie biphotonique à rayon X (DXA : Dual X Ray Absorbtiometry) est une méthode de référence dans l'étude de la composition corporelle. Elle consiste à balayer l'ensemble du corps avec un faisceau de rayons X à deux niveaux d'énergie. L'atténuation de ces rayonnements après traversée de la matière est évaluée en fonction de la composition de la matière traversée. Cette technique permet de séparer trois compartiments (masse grasse, masse maigre et contenu minéral osseux) par un traitement informatique des mesures physiques. Le balayage du corps entier et le traitement d'images permettent une approche régionale des trois compartiments mesurés.

Nos mesures ont été réalisées avec l'appareil lunar iDXATM (GE Healthcare). Le lapin est tranquilisé avant la mesure grâce à une dose de 100µg/kg de médétomidine (Domitor®Pfizer) et de 5 mg/kg de kétamine (Imalgene100, Merial) injectée en intra-veineuse dix minutes avant la mesure. A la fin de la mesure, il est réveillé avec l'antagoniste de la médétomidine : l'atipamézole (Antisedan®Pfizer) à une dose de 250 µg/kg. Les images sont ensuite analysées en utilisant le logiciel enCORE®. Pour évaluer la reproductibilité, l'analyse sur chaque lapin a été réalisée deux fois.

3.3. Prélèvements et mesures des paramètres métaboliques

3.3.1. Prélèvements de sang

Chez les lapins, les prélèvements sanguins ont été réalisés à jeun, à l'âge de 6 mois, au niveau de l'artère centrale de l'oreille. Après repérage de l'artère, une légère dépilation a été effectuée en regard du point de ponction. La dilatation de l'artère a été obtenue par réchauffement manuel de l'oreille et utilisation de l'huile essentielle de Gaulthérie, aux vertus antalgiques, anti-inflammatoires et vasodilatatrices. Une aiguille de 21G a alors été placée dans l'artère. Tous les échantillons ont été recueillis dans des tubes secs de 5 ml (1 tube par lapin). Les tubes ont ensuite été centrifugés à 3 000 tours/min, pendant 15 min, dans l'heure suivant le prélèvement, puis les sérums ont été aliquotés et stockés à -20°C.

Concernant les souris, les prélèvements sanguins ont été réalisés à jeun, à 70 jours de régime, au niveau du sinus retro-orbital, sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane, à raison de 150 µl par souris. Tous les échantillons ont été recueillis dans des tubes Eppendorf secs. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 3 000 tours/min, pendant 15 min, dans l'heure suivant le prélèvement, puis les sérums ont été stockés à -20°C.

3.3.2. Prélèvements de lait

Chez les lapines, les prélèvements de lait ont été réalisés à 3 jours (L3 début de lactation) et 10 jours (L10 lactation établie) de lactation, par traite manuelle sur des lapines vigiles sous contention, le matin avant la tétée.

Chez les souris, accouplées naturellement, les prélèvements de lait ont été réalisés à 10 jours de lactation (L10) sous anesthésie, après injection intra-péritonéale de 2 unités d'ocytocine, selon le protocole décrit par Gors *et al* (Gors *et al.* 2009).

3.3.3. Dosages de paramètres métaboliques

Les taux plasmatiques de cholestérol total, de triglycérides et de glucose ont été mesurés par colorimétrie enzymatique (Biomérieux, France) selon le protocole décrit par le fournisseur. Chaque dosage a été réalisé en triplicate.

3.3.4. Biopsies mammaires

Les souris de la cohorte 1, alimentées avec les 3 régimes depuis la puberté, et soumises au protocole de superovulation ont été opérées à 12 jours de gestation (G12) afin de réaliser une biopsie de la glande mammaire inguinale droite (Brill *et al.* 2008). La cicatrice laissée par l'opération ne compromet en rien la fin de la gestation ni la lactation, mais ne permet pas d'obtenir de lait par traite. Les biopsies ont été réalisées sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane et après injection intra-péritonéale de 0,2 ml de Finadyne à 50mg/ml (anti-douleur et anti-

inflammatoire). Après désinfection locale de la zone à l'éthanol 70%, une incision a été réalisée afin de dégager la glande mammaire inguinale droite et les vaisseaux ont été cautérisés avant de prélever au niveau de la partie ventrale située avant le nœud lymphatique. L'incision a été refermée à l'aide de 3 agrafes et une surveillance post-opératoire a été réalisée pendant les 6 heures suivant l'intervention.

Le fragment mammaire prélevé a ensuite été séparé en trois parties : une partie a été fixée pour réaliser des analyses histologiques, une partie a été étalée sur lame de verre pour faire un montage *in toto* et enfin la dernière partie a été congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C en vue de l'extraction des ARN et des protéines.

4. TECHNIQUES PERMETTANT L'ETUDE DU PHENOTYPE MAMMAIRE

L'ensemble des protocoles mis en place pour l'étude du phénotype mammaire chez la lapine, à l'exception des montages *in toto* décrit ci-dessous (paragraphe 4.1), est détaillé dans la publication 2.

4.1. Montages *in toto* de glandes mammaires

Les montages *in toto* ont été réalisés sur un fragment de tissu épithélial mammaire chez les lapines ou sur une portion de la glande mammaire inguinale droite chez les souris selon le protocole adapté de <http://mammary.nih.gov/tools/histological/wholemounts/>. Le fragment de glande mammaire a été étalé sur une lame de verre, puis fixée dans une solution de Carnoy (60% éthanol absolu, 30% chloroforme et 10% acide acétique) pendant 12 heures à température ambiante. Les lames portant les morceaux de glandes mammaires ont ensuite été rincées successivement dans un bain d'éthanol 70% pendant 15 min, puis dans de l'eau distillée pendant 5 min. Elles ont enfin été colorées toute la nuit dans une solution de rouge carmin à 0,2%. Le lendemain, les lames ont été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (de 50% à 100%) et le tissu adipeux a été rendu transparent par 2 bains d'Estisol (produit de remplacement du Xylène) de 45 min chacun. Les

lames ont été recouvertes de milieu de montage, puis d'une lamelle avant d'être photographiées sous loupe binoculaire (MZ8, Leica Microsystems GmbH, Allemagne).

4.2. Histologie

Pour les souris, comme cela a été le cas pour les lapins, les fragments de glande mammaire ont été déposés dans des cassettes et fixés par immersion dans une solution de RCl₂® pendant 12 heures à 4°C puis conservés jusqu'à l'inclusion dans une solution d'éthanol 70%. Les tissus ont ensuite été déshydratés, inclus dans des blocs de paraffine et coupés au microtome avant d'être colorés à l'hématoxyline-éosine. Cette coloration permet de visualiser le noyau en bleu-noir et le cytoplasme et la matrice en rose (Atelier d'histologie de l'unité GABI UMR1313, INRA, Jouy-en-Josas). Enfin, les lames ont été numérisées par le scanner de lames Nanozoomer (Hamamatsu Photonics, France) et analysées par les logiciels NDP.view (Hamamatsu Photonics, France) et ImageJ.

4.3. Extraction des ARNm et des protéines

Concernant les souris de la cohorte 1, l'extraction des ARN et des protéines a été réalisée à partir de 30 mg de tissu mammaire prélevé par biopsie, grâce au kit commercial d'extraction conjointe NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel, France), selon le protocole décrit par le fournisseur. Les ARNm extraits ont été quantifiés à l'aide du Nanodrop ND-1000 (Labtech, France) et analysés sur Bioanalyseur Agilent. Les protéines contenues dans les échantillons ont été dosées avec le kit Nucleospin Quantification kit (Macherey-Nagel, France) selon le protocole recommandé par le fabricant.

4.4. Quantification des transcrits par RT-PCR quantitative (RT-PCRq)

Les ARNm codant les protéines d'intérêt (leptine, ses récepteurs et GAPDH) ont été analysés et quantifiés par transcription inverse couplée à une PCR quantitative (RT-PCRq). Les réactions de transcription inverse ont été réalisées en utilisant le Kit SuperScript® VILO (Invitrogen, France) en une seule étape, selon le protocole décrit par le fournisseur, à partir de

1 à 2,5 µg d'ARN totaux de chaque échantillon de glande mammaire. La qualité des réactions de transcription inverse a été vérifiée par amplification d'un gène de ménage, l'actine β .

La réaction de PCRq a été réalisée à l'aide du Kit ABsolute Blue SYBR green ROX Mix (Thermo Scientific, France) selon le protocole décrit par le fournisseur, sur un thermocycleur RealPlex⁴ (Eppendorf®, France). Un programme « 2-step » a été utilisé pour l'amplification de l'ADN : 94°C 15 min ; 94°C 15 sec, 60°C 1 min, 40 cycles. Chaque échantillon d'ARN a été analysé en triplicate : trois réactions d'amplification indépendantes ont été effectuées à partir d'une réaction de RT. Les taux des transcrits codant la leptine et les Ob-R ont été normalisés par ceux des ARN codant le gène de ménage de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	Amplicon
Actine β	5'-GCTGTATTCCCCTCCATCGTG-3'	5'-CACGGTTGGCCTTAGGGT-3'	150 pb
Leptine	5'-CACACACGCAGTCGGTATCC-3'	5'-GTCATTGGCTATCTGCAGCA-3'	163 pb
Ob-R	5'-AAGAATTATGACTCTAAGGTCC-3'	5'-CAGTTGCATTGGACAGTCTG-3'	106 pb
GAPDH	5'-CCCAATGTGTCCGTCGTG-3'	5'-GCCTGCTTCACCACCTTCT-3'	84 pb

4.5. Analyse des protéines par western blot

Les extraits protéiques ont été dénaturés pendant 5 min à 100°C dans le tampon de Laemmli (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % β -mercaptoéthanol, 5 % SDS, 20 % sucrose, 0,05 % bleu de bromophénol), avant d'être soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide-bisacrylamide (12 %) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les protéines ont ainsi été séparées suivant leur poids moléculaire pendant la nuit à 60 V, puis elles ont été transférées sous l'effet d'un champ électrique sur une membrane de nitrocellulose 0,22 µm (Protran, Schleicher & Schuell, France) pendant 3 h 30 à 300 mA. Les membranes ont ensuite été saturées dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 (TBS-T), additionné de 5 % de lait, avant d'être hybridées pendant la nuit à 4°C, sous agitation, avec l'anticorps primaire. Les membranes ont ensuite été rincées dans plusieurs baigns de TBS-T, puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, pendant 45 min à température ambiante, sous agitation. Après trois lavages dans le tampon TBS-T, les protéines d'intérêt ont finalement été révélées avec un kit classique ECL (GE Healthcare, France).

<u>Anticorps</u>	<u>Hôte</u>	<u>Dilution</u>	<u>Fournisseur</u>	<u>Diluant</u>
anti-caséine α S1 de souris	lapin	1/4 000	Barash I, 1995	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-caséine β de souris	lapin	1/4 000	Barash I, 1995	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-caséine κ de lapin	mouton	1/2000	(Baranyi <i>et al.</i> 1996)	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-actine β	souris	1/1000	Sigma #A1978	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-MAPK	lapin	1/1000	Cell Signaling #9102	TBS-T 1X + BSA 5%
anti-MAPK phosphorylé	lapin	1/1000	Cell Signaling #9101	TBS-T 1X + BSA 5%
anti-STAT3	souris	1/1000	Upstate #06- 596	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-STAT3 phosphorylé	souris	1/2000	Millipore #05- 485	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-STAT5 phosphorylé	souris	1/2000	Genetex #GTX13593	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-STAT5	souris	1/1000	Zymed #13- 3600	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-IgG de mouton-HRP	âne	1/10 000	Sigma #A3415	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-IgG de souris-HRP	chèvre	1/2000	Sigma #A4416	TBS-T 1X + Lait 5%
anti-IgG de lapin-HRP	chèvre	1/15 000	Sigma #A0545	TBS-T 1X + Lait 5%

Figure 17 : Anticorps utilisés pour les expériences de western blot

Si besoin, les membranes ont été deshybridées pendant 15 min à température ambiante dans un tampon de deshybridation (Restore Stripping Buffer, Pierce), puis lavées avant d'être bloquées et hybridées de nouveau. Enfin, les films d'autoradiographie ont été scannés et la quantification relative a été réalisée par mesure de la densité de chaque signal, par le logiciel ImageJ. L'analyse des protéines du lait a été effectuée en utilisant 40 µg de protéines alors que pour la mise en évidence des acteurs de voies de signalisation intracellulaire, la quantité de protéines déposée sur gel a été de 100 µg.

Dans le cas des études *in vitro*, la réponse des cellules suite à la stimulation par la leptine a été évaluée par l'analyse des ratios « forme phosphorylée/forme totale » des facteurs de transduction STAT3 et MAPK.

5. ANALYSES STATISTIQUES

Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM. Les tests de Student (lorsque $n > 10$) et de Mann-Whitney (lorsque $n < 10$) ont été utilisés pour comparer les groupes. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $P \leq 0,05$.

Les données des courbes de croissances des différents groupes ont été traitées selon un modèle d'analyse de mesures répétées. Ainsi le modèle mathématique développé prend en compte la structure de corrélation entre les données par un modèle mixte avec un effet aléatoire animal et une structure de corrélation résiduelle autorégressive d'ordre 1 (AR(1)).

RESULTATS

1. ANALYSE MORPHOLOGIQUE DU DEVELOPPEMENT MAMMAIRE ET EXPRESSION DE LA LEPTINE DANS LA GLANDE MAMMAIRE DE LAPINE

1.1. Etude morphologique du développement mammaire chez la lapine

Le développement de la glande mammaire chez la lapine a largement été décrit dans l'introduction générale. Cependant peu d'images illustrant ce développement sont disponibles dans la littérature. Pour débiter ce travail sur cette espèce, nous avons réalisé des montages *in toto* de tissu mammaire de lapines à différents stades du développement, depuis la puberté, pendant la gestation, début (3^{ème} jour), milieu (14^{ème} jour) et fin (25^{ème} jour), en début de lactation (3^{ème} jour), en lactation établie (16^{ème} jour) et enfin à 3 jours d'involution (figure 18).

Dès le stade vierge, on peut observer la présence de canaux primaires qui se ramifient en canaux secondaires et tertiaires et qui se terminent par des bourgeons pendant le début de la gestation. A partir de la mi-gestation, la prolifération du tissu mammaire se traduit par un épaississement, de sorte que seuls les lobules de tissu épithélial sont visibles sur le montage *in toto*. Au moment de l'involution, l'apoptose des cellules permet d'observer de nouveau la présence des canaux. A ce stade, des différences peuvent être observées avec le stade pubère puisque le développement lobulo-alvéolaire semble persister en partie pendant l'involution. Ces différences permettent de conclure que le tissu épithélial mammaire ayant subi un cycle gestation-lactation ne redevient pas semblable à celui observé au stade vierge. Ce phénomène illustre la prolifération importante du tissu épithélial mammaire, au détriment du tissu adipeux durant la gestation et la lactation, qu'on observe chez la lapine.

Les interactions entre la CEM et la cellule adipeuse sont essentielles dans le développement mammaire et ce, quelle que soit l'espèce considérée. La leptine joue un rôle majeur dans ces interactions. Toutefois la CEM constitue également un lieu de synthèse de la leptine. Afin d'analyser l'action de cette cytokine dans ce processus, nous avons établi dans un premier temps, sa cinétique d'expression au niveau de la CEM pendant la gestation et la lactation.

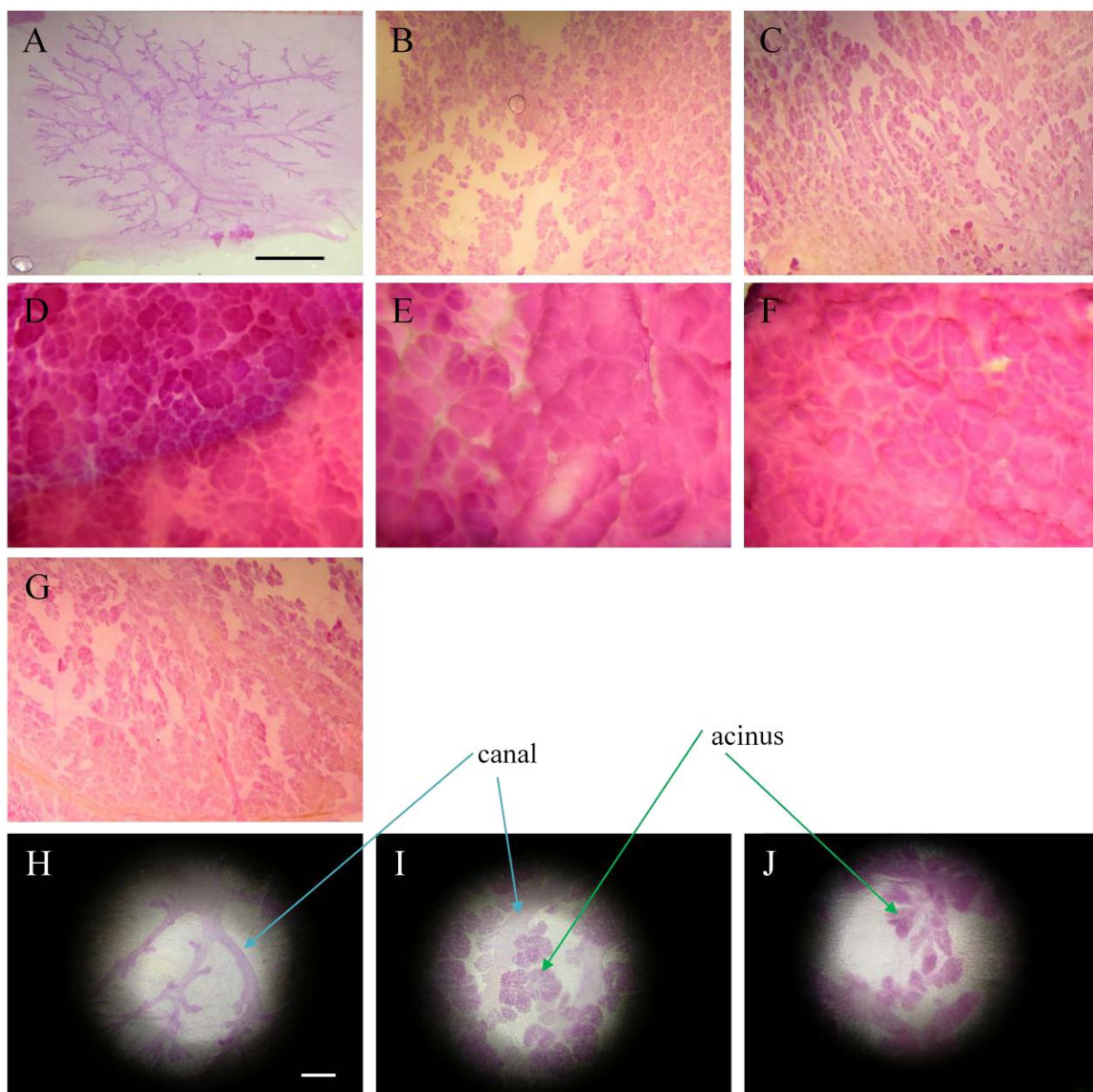


Figure 18 : Développement de la glande mammaire de lapine

Montages *in toto* de glandes mammaires de lapine aux stades : vierge 10 semaines (A), gestation 3 jours (B), 14 jours (C), 25 jours (D), lactation 3 jours (E), 16 jours (F) et involution (G). Barre d'échelle : 5mm

Observation à plus fort grossissement pour les stades vierge 10 semaines (H), gestation 3 jours (I) et involution 3 jours (J). Barre d'échelle : 0,5 mm

1.2. Etude du gène de la leptine chez le lapin : clonage et expression dans les cellules épithéliales mammaires pendant la gestation et la lactation : Publication 1

Leptin gene in rabbit: cloning and expression in mammary epithelial cells during pregnancy and lactation.

Emmanuelle Koch, Cathy Hue-Beauvais, Laurent Galio, Gili Solomon, Arie Gertler, Françoise Révillon, Valérie Lhotellier, Etienne Aujean, Eve Devinoy and Madia Charlier.

Physiol. Genomics 45:645-652, 2013. First published 28 May 2013;

Leptin gene in rabbit: cloning and expression in mammary epithelial cells during pregnancy and lactation

Emmanuelle Koch,^{1*} Cathy Hue-Beauvais,^{1*} Laurent Galio,¹ Gili Solomon,² Arie Gertler,² Françoise Révillon,³ Valérie Lhotellier,³ Etienne Aujean,¹ Eve Devinoy,¹ and Madia Charlier¹

¹INRA, UR1196, Génétique et Physiologie de la Lactation, Jouy-en-Josas, France; ²Institute of Biochemistry Food Science and Nutrition, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel; and ³Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret, Lille, Cedex, France

Submitted 31 January 2013; accepted in final form 22 May 2013

Koch E, Hue-Beauvais C, Galio L, Solomon G, Gertler A, Révillon F, Lhotellier V, Aujean E, Devinoy E, Charlier M. Leptin gene in rabbit: cloning and expression in mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *Physiol Genomics* 45: 645–652, 2013. First published May 28, 2013; doi:10.1152/physiolgenomics.00020.2013.—Leptin is known as a cytokine mostly produced by fat cells and implicated in regulation of energy metabolism and food intake but has also been shown to be involved in many physiological mechanisms such as tissue metabolism and cell differentiation and proliferation. In particular, leptin influences the development of mammary gland. Although leptin expression in mammary gland has been studied in several species, no data are available in the rabbit. Leptin transcripts in this species have been described as being encoded by only two exons rather than three as in other species. Our focus was to clone and sequence the rabbit leptin cDNA and to prepare the recombinant biologically active protein for validation of the proper sequence and then to describe leptin expression in rabbit mammary gland during different stages of pregnancy and lactation. The leptin sequence obtained was compared with those of other species, and genome alignment demonstrated that the rabbit leptin gene is also encoded by three exons. Additionally, we analyzed the expression of leptin during pregnancy and lactation. Leptin mRNA was weakly expressed throughout pregnancy, whereas mRNA levels were higher during lactation, with a significant increase between days 3 and 16. Leptin transcripts and protein were localized in luminal epithelial cells, thus indicating that leptin synthesis occurs in this compartment. Therefore, mammary synthesized leptin may constitute a major regulator of mammary gland development by acting locally as an autocrine and/or paracrine factor. Furthermore, our results support the possible physiological role of leptin in newborns through consumption of milk.

leptin; mammary epithelial cells; rabbit; sequence

LEPTIN IS AN AUTOCRINE AND paracrine factor that has been shown to be involved in regulating energy metabolism and food intake (19). Leptin is a 16 kDa cytokine mainly secreted by adipocytes (45), which acts via the leptin receptor (Ob-R), mainly at the hypothalamic level, but also targets other tissues (2). Leptin is also implicated in numerous other roles, such as tissue metabolism (4, 6, 44), blood pressure (12), hematopoiesis (34), brain and bone development (3, 41, 42), and cell differentiation and proliferation (16). Moreover, it influences the development of the mammary gland and affects the subsequent lactation (15).

* E. Koch and C. Hue-Beauvais contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: M. Charlier, INRA, UR1196, Génétique et Physiologie de la Lactation, F78350, Jouy-en-Josas, France (e-mail: madia.charlier@jouy.inra.fr).

Leptin is encoded by the *ob* gene, which is composed of three exons in most species (18, 21, 22, 45), except in the rabbit where only two exons have been described (43). Transcripts are strongly expressed in adipose tissue and increase in diet-induced obesity (16). However, other studies have demonstrated that leptin mRNA are also detectable in several peripheral tissues such as the mammary gland (7, 10, 37–39). Leptin has been reported to be produced both in mammary epithelial cells prior to parturition in humans (39), sheep (10), rodents (7) and cattle (8), and in myoepithelial cells (10) after parturition.

Our objective was to gain a comprehensive view of leptin expression in the mammary gland throughout pregnancy and lactation in rabbits. Such data are of importance because maternally produced leptin is secreted into milk (7) and is taken up by the newborn during suckling (11). Thus leptin may enter the circulation of the newborn as already described in rat (31, 33) and contribute to reorganization of the central neural pathways. Indeed, leptin has strong neurotrophic properties that may underlie some developmental changes during the perinatal period (1, 24, 30). The study of induced metabolic syndrome in the rabbit is a pertinent model because of this animal's predisposition to accumulate visceral fat when subjected to a high-lipid diet. We therefore chose this species as our model. However, as no information about the presence and expression of leptin in rabbit mammary tissue has been published to date, our aim was to determine whether the leptin gene structure in this species differed from that seen in other species.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

All animal studies were carried out in compliance with French regulations on animal experimentation and with the authorization of the French Ministry of Agriculture (Animal Health and Protection Directorate, accreditation number 78-119).

We housed 18 female rabbits (New Zealand White, 1077-INRA) individually in an indoor facility under controlled light conditions (8 h light/16 h darkness except from the week before mating when they were under 16 h light/8 h darkness) and temperature (18°C).

The rabbits were killed during early (day 3, three animals), mid-(days 9–14, five animals), and late pregnancy (days 25–29, three animals) and during lactation on days 3 (three animals) and 16 (three animals). After animals were euthanized, the left lower mammary gland from each animal was excised and dissected. Mammary epithelial tissue and surrounding mammary adipose tissue were either processed or snap-frozen and stored for later RNA isolation, immunohistochemistry, and in situ hybridization (ISH).

Isolation of RNA and Reverse Transcription

Total RNA was isolated from the mammary epithelial tissue and from the surrounding adipose tissue by Trizol extraction according to manufacturer's protocol (Invitrogen). RNA integrity (RIN: RNA integrity number) was assessed with an Agilent Bioanalyzer (average RIN of 9.1 for our samples) with a cut-off value of 8. RNA was kept at -80°C until further analyses.

Cloning of Rabbit Leptin cDNA From Mammary Adipose Tissue

We reverse transcribed 5 μg of total RNA in a total volume of 20 μl containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM deoxy-NTP, 0.5 μg oligo-dT, 0.1 μg hexamer primers (Roche), and 1 U Superscript II (Invitrogen). The reaction temperatures were 42°C for 1 h and 70°C for 15 min.

Regions with high interspecies similarities between human and mouse leptin sequences were used to design primers to amplify larger regions than those already described in the rabbit (45). The oligonucleotide primers for leptin used were as follows, forward primers: RL1: 5'-GGCCCGAGAAACATCCTGGG-3' and RL3: 5'-GGAG-GAGTCCCGGCGCCAGC-3' and reverse primer: RL2: 5'-GGGAA-GAGCAGCCCCAGGGG-3'. Amplification reactions (50 μl) were performed using 3 μl of the reverse transcription (RT) products, 10 \times PCR Master Mix (5 μl , MP Biomedicals), 200 μM of each primer, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals). Thermal cycling proceeded with 30 cycles at 95°C for 1 min, either 60°C (primers RL1 and RL2) or 65°C (primers RL3 and RL2) for 1 min and 72°C for 1 min, with a final step of 10 min at 72°C . The purified 554 bp (primers RL1 and RL2) or 582 bp (primers RL3 and RL2) PCR products were subcloned into a pGEM-T Easy vector (Promega) according to manufacturer's instructions. The presence of the inserts in purified recombinant plasmids was determined by PCR, and five clones were sequenced (MWG). The sequences of cloned fragments were aligned using the National Center for Biotechnology Information's public domain database. The nucleotide sequence data described in this paper were submitted to GenBank and assigned the accession numbers JX262378 (554 bp DNA fragment) and KC461185 (582 bp DNA fragment). The 554 bp cDNA fragment was used to prepare recombinant leptin, while the 582 bp constitutes the full-length rabbit leptin cDNA.

Preparation of Recombinant Rabbit Leptin

Preparation of a rabbit leptin prokaryotic expression plasmid. The 554 bp cDNA fragment of rabbit leptin cloned into the pBluescript vector, prepared previously, served as the starting material. To facilitate its transfer to the prokaryotic pMon3401 vector, PCR was performed to introduce new *NcoI* and *HindIII* restriction sites at the 5'- and 3'-ends respectively, along with an additional Met-Ala encoding sequence (Met being cleaved by bacteria), thus enabling subsequent subcloning of the rabbit leptin cDNA into the pMon3401 vector linearized with *NcoI* and *HindIII*. The PCR product was digested with *NcoI* and *HindIII* restriction enzymes and purified by electrophoresis in 1% agarose gel and a GeneClean II purification kit (BIO 101, Carlsbad, CA). The rabbit leptin cDNA was then ligated to the pMon3401 expression vector. *Escherichia coli* MON105-competent cells were transformed with the new expression plasmid and plated on LB-agar plates containing 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ spectinomycin for plasmid selection. Four *E. coli* colonies were isolated and confirmed to contain the rabbit leptin cDNA by digestion with *NcoI/HindIII* restriction enzymes. All colonies were positive and expressed rabbit leptin, and one of them (clone 1) was sequenced and used for large-scale rabbit leptin preparation.

Expression, refolding, and purification of rabbit leptin. Recombinant rabbit leptin with an extra Ala at the NH_2 terminus was expressed in a 2.5 l culture. After an optical density of 0.9 was attained, nalidixic acid was added to reach a final concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and was

then grown for an additional 4 h. Inclusion bodies (IBs) were then prepared as described previously (40) and frozen. Subsequently, IBs obtained from 2.5 l of bacterial culture were solubilized in 250 ml 4.5 M urea and 40 mM Tris base containing 0.1 mM cysteine. The pH of the solution was adjusted to 11.3 with NaOH. After 2 h of stirring at 4°C , we added three volumes of 0.67 M Arg to a final concentration of 0.5 M and stirred for an additional 0.5 h. The solution was then dialyzed against 10 l of 10 mM Tris-HCl, pH 10 for 60 h, with five external solution exchanges. NaCl was added to a final concentration of 150 mM, and the protein solution was applied at maximum flow rate (400–500 ml/h) to a Q-Sepharose column (30 ml bead volume), pre-equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 10, and containing 150 mM NaCl. The flow-through fraction, which contained the rabbit leptin, was collected, concentrated sixfold, and applied in 10 consecutive 18 ml portions to a preparative Superdex 75 column (2.6×60 cm) pre-equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 9, and containing 150 mM NaCl. Fractions containing the monomeric protein as determined by analytical gel filtration were pooled, dialyzed against NaHCO_3 to ensure a 4:1 (wt/wt) protein-to-salt ratio, and lyophilized.

Determination of purity and monomer content. SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (28) on a 15% polyacrylamide gel under reducing and nonreducing conditions. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R. Gel filtration chromatography was performed on a Superdex 75 HR 10/30 column with 0.2 ml aliquots of Q-Sepharose column-eluted or preparative Superdex 200 column-eluted fractions with TN buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8).

BaF3 proliferation assays. The proliferation rate of leptin-sensitive BaF3 1442-Cl 4 cells transfected with the long form of human leptin receptor was used to estimate the agonistic activity of rabbit leptin, by the MTT method as previously described (35).

Quantitative RT-PCR of Rabbit Leptin mRNA From Mammary Epithelial and Adipose Tissues

The primers and the TaqMan Minor Groove Binder (MGB) fluorescent probe used for leptin had the following sequences: sense primer 5'-CACACGCAGTCGGTCTCCT-3', antisense primer 5'-GTTTGGACTTCATCCCTGGC-3', and probe 5'-CAGACAGAGGG-TCTGC-3'.

To account for variations in RNA quantity and quality, the expression of leptin was normalized to a housekeeping gene. The Norm-Finder program (5) was used to assess the variability of four candidate reference genes (PPIA, GAPDH, TBP, and PUM1 genes). TBP was the gene with the most stable expression and was therefore used as the reference gene during this study. The results for the leptin gene are thus expressed as a ratio using the selected reference gene, namely TBP. The sequences of the primers and TaqManMGB probe (Applied Biosystems) used for TBP were as follows: sense primer 5'-AGC-GCTGATTTTCAGTTCTGG-3', antisense primer 5'-AGAACATG-GTGGGGAGCTGT-3', and probe 5'-TGTGCACAGGAGCCAAG-AGTGAAGA-3'.

RT and PCR were performed by a one-step method with 100 ng of total RNA using a LightCycler 480 Real Time PCR System (Roche Diagnostics). For both TBP and leptin, the reaction mixture (20 μl final volume) contained 10 μl 2 \times Master mix (Reverse Transcriptase qPCR Master Mix, Eurogentec) including HotGoldStar DNA polymerase and deoxynucleotide triphosphate, 5 units of EuroScript reverse transcriptase, 2 units of RNase inhibitor, 200 nM primers, and the MGB probe. RT was performed at 48°C for 30 min. After incubation for 10 min at 95°C , PCR was carried out for 15 s at 95°C and 1 min at 60°C for 45 cycles.

A nontemplate control was included in each experiment. The nontemplate controls and the samples were assayed in triplicate. Three separate experiments were performed.

The relative quantification of target gene expression was achieved using the comparative cycle threshold method (C_T) (Applied Biosystems, User bulletin no 2, Relative quantification of gene expression;

1997), where the C_T variable is defined as the cycle number at which the fluorescent signal generated by cleavage of the dual-labeled probe is first detectable. This method is based on the use of a calibrator sample (i.e., $1 \times$ sample), which permits quantification in unknown samples. The mammary gland at day 16 of lactation (L16) was chosen as the calibrator sample (i.e., target expression = 1) since preliminary data showed a high expression level of leptin.

The relative target expression was given by the formula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ sample} - \Delta C_T \text{ calibrator sample}$; with $\Delta C_T = C_{T \text{ TARGET}} - C_{TBP}$.

All data were evaluated by the Mann-Whitney *U*-test. *P* values of <0.05 were considered as statistically significant.

Immunohistological Analyses of Mammary Tissue

For immunohistochemistry, mammary tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at 4°C. The samples were then cryoprotected in 40% sucrose, embedded in TissueTek (Sakura, Torrance, CA), and kept in liquid nitrogen before being stored at -80°C . We mounted 5 μm sections on slides.

Leptin, cytokeratin 8, and smooth muscle actin were localized by immunohistochemical analyses using the following dilutions of primary antibodies: goat anti-rat leptin (1:100, AbDSerotec), mouse anti-cytokeratin 8 (1:100, Covance), and mouse anti-smooth muscle actin (1:500) (Sigma). Briefly, 5 μm thick frozen sections were treated in 50 mM ammonium chloride for 30 min followed by permeabilization in 2% BSA, 0.05% saponin, and 0.05% sodium azide in PBS $1 \times$ for 1 h. The tissue sections were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in the same buffer. After being washed, antibody binding was visualized after incubation for 45 min with fluorescence-labeled secondary antibodies (anti-goat TRITC-conjugated, 1:300, and anti-mouse FITC-conjugated, 1:300, Jackson ImmunoResearch) in PBS $1 \times$. 4,6-Diamidino-2-phenylindole was diluted to 1:500 in PBS $1 \times$ and applied for 3 min at room temperature as a nuclear counterstain. The secondary antibody control slide was treated as the others, with the omission of the goat anti-rat leptin antibody. As a control, the primary goat anti-rat leptin antibody was incubated for 1 h at room temperature with recombinant rabbit leptin in an excess quantity (3-fold), before treatment.

The slides were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and observed with a Zeiss microscope coupled with ApoTome technology at the MIMA2 facilities (INRA, F78350 Jouy-en-Josas, France).

ISH

LNA-modified DNA probes were synthesized by Eurogentec. The sequences of the LNA-modified oligonucleotides (LNA-modified bases shown in upper case) were: leptin probe, 5'-gCccTatC-cgTccTgtGttCc-3'; nonspecific antisense probe, 5'-gGaaCacAggAcg-GatAggGc-3'.

We digoxigenin (DIG)-labeled 100 pmol of leptin and antisense control LNA-probes using the 3'-terminal transferase labeling kit (Roche) for 30 min at 37°C. The ISH protocol was performed as described (17). Briefly, 7 μm thick frozen sections of mammary tissue were postfixed for 10 min in 4% PFA in PBS (pH 7.5), acetylated for 10 min (100.4 mM triethanolamine, 21 mM HCl, 26.5 mM anhydride acetic acid), and finally digested with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K (Roche Diagnostics) for 5 min. The sections were incubated for 30 min at room temperature in prehybridization buffer (50% formamide, $5 \times$ SSC, $5 \times$ Denhardt's, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yeast RNA, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA, and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Roche blocking reagent) and then for 1 h at 55°C in hybridization buffer (the same as the prehybridization buffer plus 0.25% CHAPS, 0.1% Tween 20) containing the probes. The sections were then washed three times for 15 min in $0.2 \times$ SSC at 60°C followed by serial incubations for 10 min in buffer A (100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl), for 30 min in blocking solution (buffer A supplemented with 10% fetal calf serum and 0.05% Tween 20), and

for 1 h in the anti-DIG antibody (anti-DIG-PA Fab fragments, Roche) diluted to 1/2,000 in blocking solution. After three washes in buffer A, the pH of the sections was equilibrated at pH 9.5 for 10 min in buffer B (100 mM Tris pH 9, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2). Revelation was achieved with a solution stabilized with nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine (Eurobio) for 15 h. The slides were finally mounted in Diamount mounting medium (Diapath, MicromMicrotech).

RESULTS

Cloning and Sequencing of Rabbit Leptin cDNA

The DNA fragment we cloned from rabbit mammary adipose tissue by RT-PCR using RL1 and RL2 primers designed in leptin mRNA conserved regions was 554 nucleotides in length. It contained a 501 bp open reading frame (ORF) encoding a putative polypeptide of 167 amino acids. The amino acid sequence was similar to the leptin sequences of other species. The NH_2 terminus displayed features consistent with a signal peptide of 21 residues, as defined by SignalP program analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A predicted cleavage site could therefore be expected between amino acid positions 21 and 22, giving rise to a mature protein with a predicted molecular weight of 16 kDa and a theoretical isoelectric point 6.31. The cloned PCR fragment also contained a 29-nucleotide 5'-untranslated region (UTR) and a 23-nucleotide 3'-UTR.

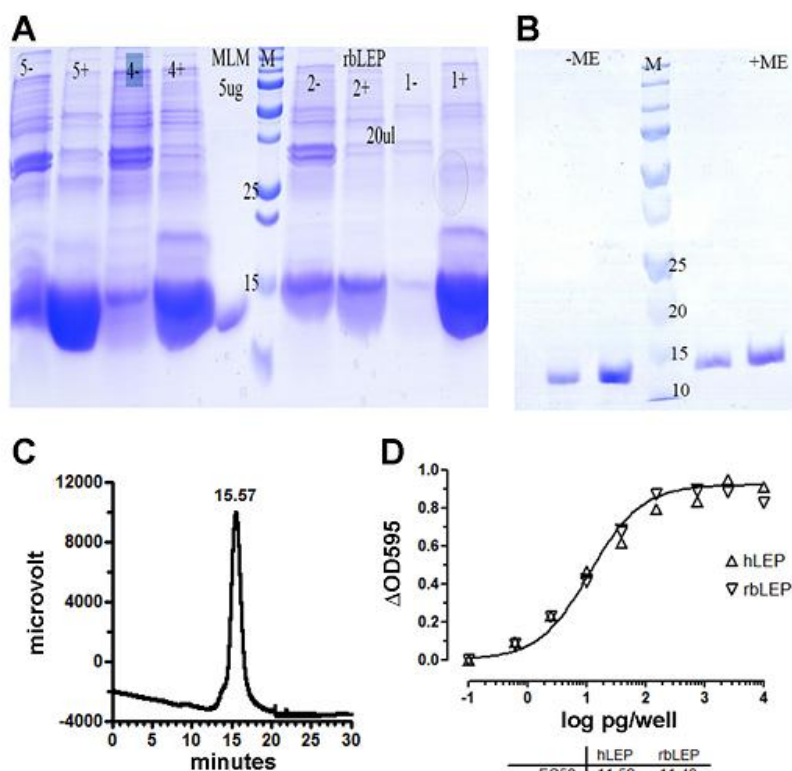
The cloned sequences were aligned with the rabbit leptin mRNA sequence whose coding region has already been described (43) and with the rabbit leptin gene (Ensembl). In the cloned sequences, there were seven nucleotide differences from the two sequences already described, corresponding to codons 8, 12, 15, 16, 118, 163, and 164 of the preprotein. Three of them were silent substitutions (12, 118, and 163) whereas the other three, in the signal peptide, resulted in substitutions of R to Q, C to Y, and L to P, respectively, and one in the mature protein resulted in D to S. These differences probably represented natural polymorphisms among different strains of rabbits. The sequence we report here extended the coding sequence to 5'- and 3'-regions. Both 3'- and 5'-sequences presented 100% similarities with the rabbit genome sequence. When the leptin cDNA sequence we obtained was compared with other vertebrate leptin mRNA sequences, we observed that it was closer to human than to mouse sequences (83.8 vs. 78.7%).

Genome alignment between the rabbit and other mammalian species revealed that a conserved region was located further upstream of the above ORF and included a TATA box and a putative first exon. We therefore designed a primer (RL3) in the first putative exon and were able to amplify the anticipated 582 bp fragment whose nucleotide sequence was identical to that of the 554 bp cDNA fragment except that it contained 28 additional nucleotides upstream. Our data led to the conclusion that in the rabbit the leptin gene contains three exons, which is consistent with data presented in other species.

Preparation and Characterization of Rabbit Leptin

Preliminary experiments in four *E. coli* clones designed to express rabbit leptin indicated strong expression in most of them (Fig. 1A). Clone 1 was selected for large-scale expression. After refolding and dialysis, rabbit leptin was purified by

Fig. 1. A: miniexpression of 4 clones of rabbit leptin. The bacteria were cultured in 30 ml of TB medium at 37°C, and the expression was induced by nalidixic acid. After 4 h the culture was centrifuged and frozen. Next day the pellets were digested with lysozyme and DNase and sonicated. The supernatant was saved, and the pellet was sonicated again and suspended in 1 ml distilled deionized water. Aliquots (corresponding to 16 μ l) were separated by 15% SDS-PAGE. Lanes marked with + were induced by nalidixic acid, and lanes marked with - were the noninduced cultures. The molecular mass markers from the bottom up (lane 4) are (in kDa): 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, and 250. The sample marked MLM is mouse leptin (5 μ g/lane). B: SDS-PAGE (15%) of purified rabbit prolactin run after lyophilization in absence (lanes 1–2 from the left) or presence (lanes 4–5 from the left) of β -mercaptoethanol (ME) at 2 concentrations: lanes 1 and 4 = 5 μ g, lanes 2 and 5 = 10 μ g. Lane 3, molecular weight markers (see above); C: gel-filtration analysis of the purified rabbit leptin on analytical Superdex 75 column pre-equilibrated with TN buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8). The main peak with retention time of 15.57 min corresponds to monomer and the preceding small shoulder to dimer. To estimate the molecular mass the column was calibrated with BSA (66 kDa), rat ciliary neurotrophic factor (CNTF) (22 kDa) and human leptin (16 kDa). D: effect of rabbit and human leptin on proliferation of BaF3 cells stably transfected with the long form of human leptin receptor (hLEPR). A representative experiment (out of 3 performed) is shown. The results are presented as means \pm SE, but the SE values are in most cases so small that they could not be seen on the graph. For other details, see text.



consecutive anion-exchange and gel-filtration chromatography. The fractions containing pure monomer were pooled and dialyzed against NaHCO_3 at pH 8 and a 4:1 (wt/wt) protein-salt ratio and then lyophilized. The yield was 300 mg from 2.5 l of bacterial culture. The purity and homogeneity of the purified leptin were documented by three separate methods. SDS-PAGE yielded only one band of ~16 kDa under both reducing and nonreducing conditions (Fig. 1B), and reverse-phase chromatography also yielded a single peak (not shown). As expected, in the absence of a reducing agent, mobility was slightly higher, indicating a globular structure. The band appeared slightly below the 15 kDa protein marker despite the predicted 16 kDa molecular mass. Since bands of the same size had also been observed in human and ovine leptins (not shown), this discrepancy was likely related to the slower mobility of the marker. Gel filtration at pH 8 under native conditions yielded a single monomeric peak consisting of >95% monomer, corresponding to a molecular mass of ~15–16 kDa (Fig. 1C). Specific extinction coefficients at 280 nm for a 0.1% solution, assuming an extra Ala at the NH_2 terminus, were calculated according to the method already described (29) and yielded a value of 0.200. The biological activity of the purified rabbit leptin was tested using a BaF3 bioassay. Both rabbit and human ovine leptins exhibited almost identical activity with their respective EC_{50} values of ~11.5 pg per well (Fig. 1D) or 6.5 pM, close to the previously reported value of 6.8 pM for human leptin (36). The stability of rabbit leptin in solution was tested during storage at 4 and 37°C as sterile 0.2 mM solutions for at least 14 days at pH 6 or 8; no changes were observed in their monomeric content, and their activity in the BaF3 bioassay was retained.

Expression of Leptin mRNA in Rabbit Mammary Gland During Pregnancy and Lactation

During pregnancy, leptin mRNA in mammary epithelial tissue was weakly expressed but detectable at all stages. By the third day of lactation, we observed an increase in leptin mRNA expression levels compared with pregnancy samples (leptin/TBP ratios of 3.22 vs. 0.72, respectively; $P = 0.05$). Leptin mRNA expression continued to increase during lactation; indeed, at day 16 of lactation, the ratio leptin/TBP reached 12.61 ($P = 0.05$) (Fig. 2). Compared with the mammary-surrounding

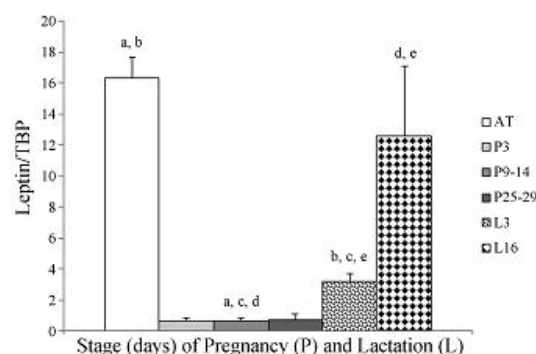


Fig. 2. Quantification of leptin mRNA in mammary gland throughout pregnancy and lactation determined by reverse transcription and real-time polymerase chain reaction assay. Leptin and TBP levels were measured from adipose tissue (AT) and mammary tissue collected from rabbits at 3, 9–14, and 25–29 days of pregnancy (P3, P9–P14, P25–P29, respectively) and at 3 (L3) and 16 days (L16) of lactation. Leptin/TBP mRNA ratios were calculated. Significant differences (at least $P < 0.05$) among the stages are indicated with different letters.

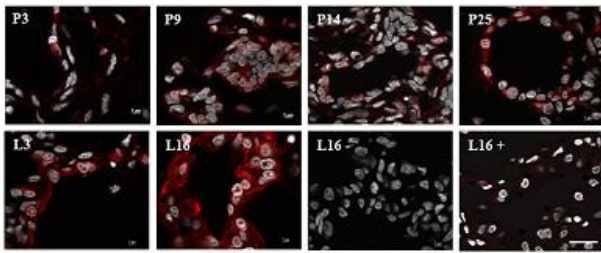


Fig. 3. Immunolocalization of leptin with a TRITC-conjugated antibody in rabbit mammary gland from pregnancy (P3, P9, P14, P25) and lactation (L3 and L16). Negative control (L16-) and specific control (L16+) are also shown. Nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The scale bar represents 20 μ m.

adipose tissue, leptin transcripts in the mammary gland were expressed at lower levels until early lactation but at equivalent levels by midlactation (L16).

Temporal Expression of Leptin in Rabbit Mammary Gland

The mammary gland is a complex tissue in which the acini develop from pregnancy to lactation. To verify whether leptin is produced by acini, mammary glands were collected at various stages of pregnancy and lactation, and cryosections were analyzed by indirect immunofluorescence using an anti-leptin antibody. All acini were labeled in mammary gland sections (Fig. 3).

Even though we have not used a quantitative method, we observed that during the first half of pregnancy the leptin signal was detectable, although weak [pregnancy day 3 (P3) to pregnancy day 14 (P14)]. This signal appeared stronger toward the end of pregnancy (P25). A strong labeling could be observed on L3 and L16. At all stages of pregnancy and lactation, no signal was detected when a secondary antibody was added alone (L16-). Moreover, no specific signal was observed when anti-leptin antibody was preadsorbed with leptin (L16+),

further demonstrating the specificity of the immunolabeling technique.

Tissue Localization of Leptin mRNA in Rabbit Mammary Gland

To determine whether the leptin detected above in the alveolar compartment was produced locally, ISHs were performed with a DIG-labeled oligonucleotide LNA probe on rabbit mammary gland sections at selected physiological stages (Fig. 4; P9, P25, L3, and L16). The signal was mainly observed in the alveolar compartment at all stages, even though some extremely weak signals could be detected in some stromal cells. Leptin probe specificity was assessed at all stages using an antisense oligonucleotide LNA probe. A representative image is shown in Fig. 4 (P25 antisense). In the same way, the specificity at all stages of the alkaline phosphatase-coupled anti-DIG antibody was controlled in experiments run in the absence of a DIG-labeled oligonucleotide LNA probe. A representative image is depicted in Fig. 4 (P25-). These results show that leptin transcripts were expressed in alveolar cells, thus demonstrating a local production of this protein.

Cellular Localization of Leptin in Rabbit Mammary Gland

To determine which cells in the mammary alveoli express leptin, we performed a double staining analysis using antibodies to leptin and CK8 or leptin and smooth muscle actin. These latter antibodies are specific to the epithelial and myoepithelial cells surrounding mammary alveoli, respectively. These experiments were performed on P16 when leptin had reached its peak of expression in the mammary gland, as already shown in Fig. 4.

When observed at a low magnification, all luminal alveolar cells expressed leptin (Fig. 5A). These cells, strongly stained with CK8 antibody as well, are luminal epithelial cells. At a higher magnification, a signal (Fig. 5B1) was also localized in

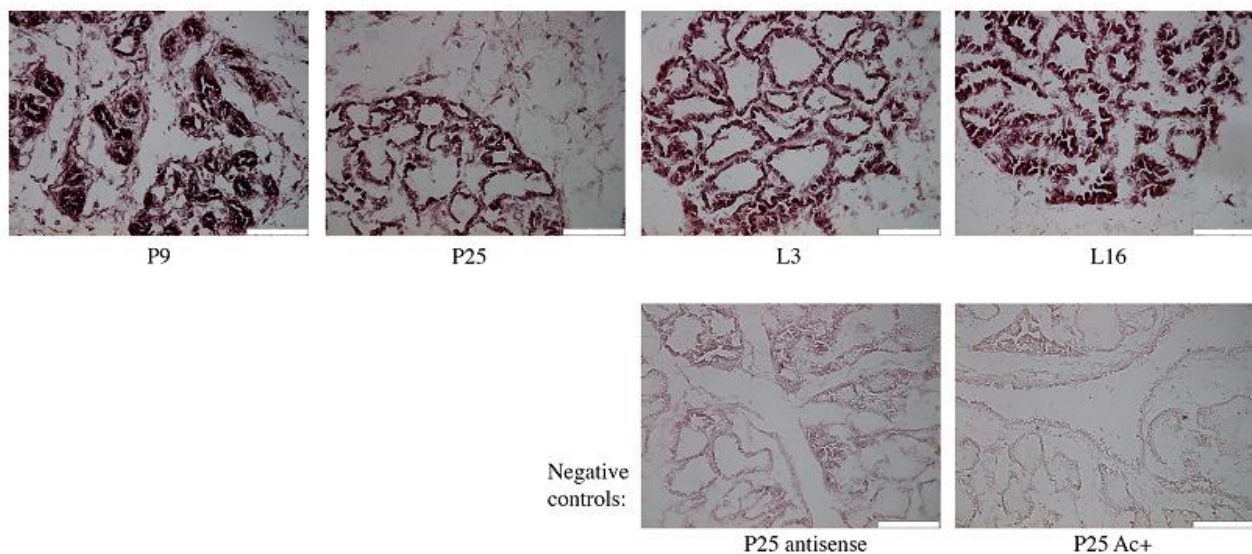


Fig. 4. Expression of leptin mRNA detected by in situ hybridization on rabbit mammary gland sections at different stages of pregnancy and lactation. Leptin mRNA expression was detected by in situ hybridization with a digoxigenin (DIG)-labeled oligo LNA probe onto mammary gland sections at different stages of pregnancy (P9 and P25) and lactation (L3 and L16). We performed 2 negative controls on 25-day pregnancy sections either with an antisense LNA probe (P25 antisense) or in experiments run in the absence of DIG-labeled oligonucleotide LNA probe (P25 Ac-). Scale bars, 200 μ m.

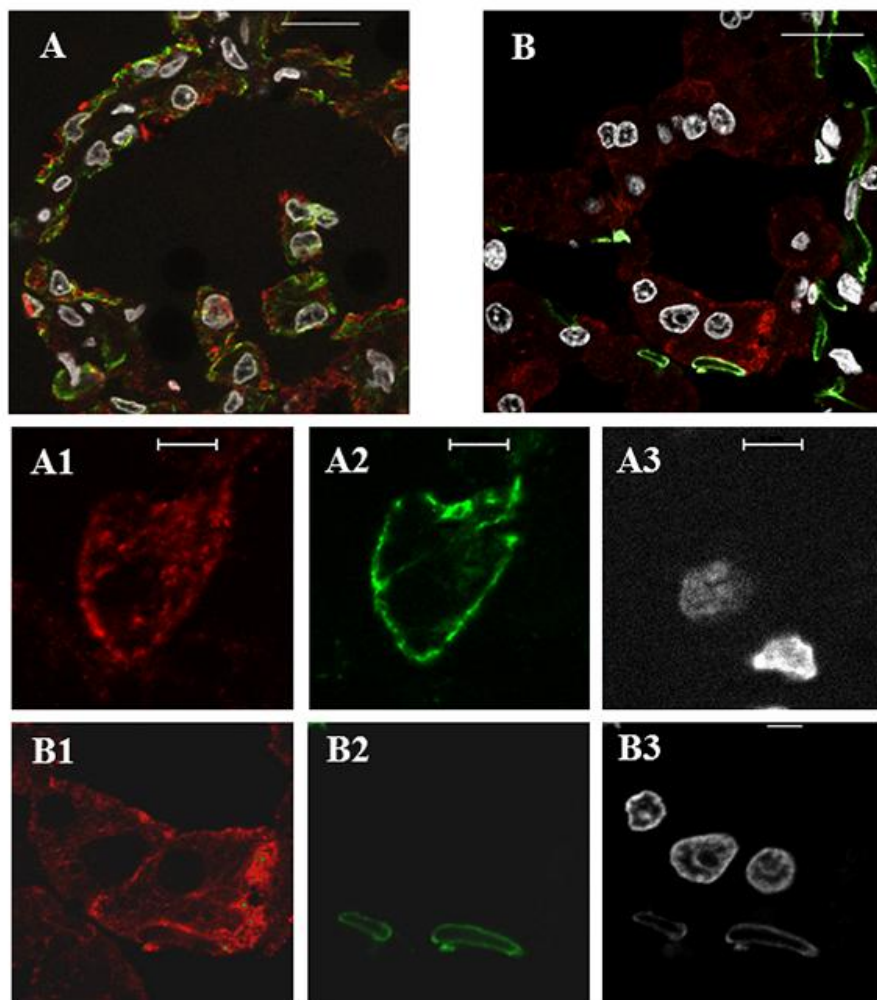


Fig. 5. Double staining of leptin (red: A, B, A1, and B1) and cytokeratin 8 (green: A and A2) or smooth muscle actin (green: B and B2) on tissue sections of rabbit mammary gland on L16. Higher magnifications are shown in A1–A3 and B1–B3, and each channel is separated: A1 or B1 (leptin), A2 (cytokeratin 8) or B2 (smooth muscle actin), and A3 or B3 (nuclei). Nuclei were stained with DAPI. The scale bar represents respectively 20 μ m (A, B) and 10 μ m (A1–B3).

the cytoplasm of some cells, stained with smooth muscle actin antibody (Fig. 5B2) and which could easily be recognized as myoepithelial cells from both their elongated shape and elongated nuclei (Fig. 5B3).

DISCUSSION

During this study, full-length leptin cDNA was cloned from rabbit adipose tissue and shown to encode a predicted polypeptide of 167 amino acids with a theoretical value of 18.24 kDa and an isoelectric point of 7.62. Consistent with the other known leptin sequences, it contained a predicted 21-amino acid signal peptide. The respectively prepared recombinant rabbit leptin exhibited biological activity similar to that seen in other mammalian species, thus verifying the correctness of the predicted amino acid sequence. Alignment of the nucleotide sequence of rabbit leptin with human and mouse sequences revealed a greater similarity with human than with mouse. This was confirmed from examination of the amino acid sequences, 80.2 vs. 79.8%.

We also report evidence that rabbit mammary tissue expresses leptin mRNA and protein during pregnancy and lactation. These findings are in agreement with the synthesis of leptin previously described in humans (39), mice (7), sheep

(10), and cattle (8). We further show that leptin gene expression in rabbit mammary glands is strongly dependent on the stage of pregnancy or lactation. However, our data contrasted with some previous findings in different animal models. In mouse and ovine models, leptin expression in the mammary gland throughout lactation was significantly lower than during pregnancy (7, 10). Possible interspecies differences could be related to species-specific endocrine profiles and subsequent hormonal regulation.

Using an immunohistochemical approach, we were thus able to clearly establish that leptin is present in the rabbit mammary gland. Moreover, the expression pattern of the protein mirrored that of mRNA assessed by real-time PCR.

Using ISH with specific oligo-LNA probes, we demonstrated that leptin is synthesized by mammary secretory tissue during both pregnancy and lactation. During the early stages of pregnancy, stromal tissue containing adipocytes is predominant in the mammary gland. Because we focused our studies on the epithelium, we chose to use cryosections to minimize leptin signals due to adipocytes. Even though they represented a major source of leptin, mammary adipocytes were therefore scarcely labeled in our ISH experiments. By contrast, after full cell differentiation during lactogenesis, adipose tissue had

clearly regressed in the mammary gland so that local leptin mRNA synthesis was not due to that cell population.

Specific mammary epithelial and myoepithelial cell markers (CK8 and α -smooth muscle actin, respectively) were used to discriminate between the luminal epithelial and basal myoepithelial production of leptin during the period of its strongest expression. At midlactation, leptin was clearly present in the cytoplasm of luminal epithelial cells and detected in a few basal myoepithelial cells. Although our experiments clearly showed that mRNA was present in luminal cells, ISH experiments did not show if basal cells, which exhibit typical myoepithelial phenotype, also expressed this transcript. It is nonetheless likely that the local synthesis of leptin mRNA also occurs in myoepithelial cells during lactation as already described in sheep (10). However, in contrast to sheep, in the rabbit, leptin is not produced exclusively by myoepithelial cells during lactation. Our findings are in line with those describing leptin expression in a human breast epithelial cell line (27). Leptin production by mammary epithelial cells is of considerable interest because leptin receptors have also been observed in mammary epithelial cells in several species (7, 8, 23, 25, 38) including rabbit (preliminary results). These data strongly support the hypothesis that leptin may constitute a major local regulator of mammary gland development. By acting as an autocrine and/or paracrine factor, leptin may contribute to the modulation of mammary growth and differentiation. Moreover, leptin gene expression by the rabbit mammary gland may be related to leptin secretion into colostrum and milk, as has already been observed in humans (9, 11, 13, 20, 26, 39), rats (11), cows (32), pigs (14), and mice (7). The presence of leptin in breast milk raises important questions as to the possible physiological role of this cytokine in newborns and particularly its effect in the metabolic imprinting process.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. D. Thépot for his assistance with computational analyses for within-species comparisons.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: E.K., C.H.-B., L.G., G.S., A.G., V.L., E.A., and M.C. performed experiments; E.K., C.H.-B., L.G., G.S., A.G., F.R., V.L., and M.C. analyzed data; E.K., C.H.-B., L.G., G.S., A.G., F.R., and M.C. interpreted results of experiments; E.K., C.H.-B., L.G., G.S., A.G., and M.C. prepared figures; E.K., C.H.-B., L.G., E.D., and M.C. drafted manuscript; E.K., C.H.-B., L.G., G.S., A.G., F.R., V.L., E.A., E.D., and M.C. approved final version of manuscript; C.H.-B., G.S., A.G., E.D., and M.C. edited and revised manuscript; M.C. conception and design of research.

REFERENCES

- Agostoni C. Ghrelin, leptin and the neurometabolic axis of breastfed and formula-fed infants. *Acta Paediatr* 94: 523–525, 2005.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413–437, 2000.
- Ahima RS, Hileman SM. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. *Regul Pept* 92: 1–7, 2000.
- Altmann M, Sauerwein H, von Borell E. Plasma leptin in growing lambs as a potential predictor for carcass composition and daily gain. *Meat Sci* 74: 600–604, 2006.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245–5250, 2004.
- Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab* 10: 973–993, 2008.
- Aoki N, Kawamura M, Matsuda T. Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 1427: 298–306, 1999.
- Bartha T, Sayed-Ahmed A, Rudas P. Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 29: 193–202, 2005.
- Bielicki J, Huch R, von Mandach U. Time-course of leptin levels in term and preterm human milk. *Eur J Endocrinol* 151: 271–276, 2004.
- Bonnet M, Gourdou I, Leroux C, Chilliard Y, Djiane J. Leptin expression in the ovine mammary gland: putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci* 80: 723–728, 2002.
- Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4270–4273, 1997.
- da Silva AA, Carmo JM, Hall JE. Role of leptin and central nervous system melanocortins in obesity hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22: 135–140, 2013.
- Eilers E, Ziska T, Harder T, Plagemann A, Obladen M, Loui A. Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. *Early Hum Dev* 87: 415–419, 2011.
- Estienne MJ, Harper AF, Barb CR, Azain MJ. Concentrations of leptin in serum and milk collected from lactating sows differing in body condition. *Domest Anim Endocrinol* 19: 275–280, 2000.
- Feuermann Y, Mahjesh SJ, Niv-Spector L, Levin D, Shamay A. Prolactin affects leptin action in the bovine mammary gland via the mammary fat pad. *J Endocrinol* 191: 407–413, 2006.
- Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60: S1–S14, 2002.
- Galio L, Droineau S, Yeboah P, Boudiaf H, Bouet S, Truchet S, Devinoy E. microRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205 and miR-200. *Physiol Genomics* 15: 151–161, 2013.
- Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271: 3971–3974, 1996.
- Harris RB. Leptin—much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 20: 45–75, 2000.
- Houseknecht KL, McGuire MK, Portocarrero CP, McGuire MA, Beerman K. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 742–747, 1997.
- Iwase M, Kimura K, Sasaki N, Komagome R, Ishioka K, Morimatsu M, Murakami T, Saito M. Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. *Res Vet Sci* 68: 109–114, 2000.
- Konfortov BA, Licence VE, Miller JR. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. *Mamm Genome* 10: 1142–1145, 1999.
- Laud K, Gourdou I, Bélair L, Keisler DH, Djiane J. Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS Lett* 463: 194–198, 1999.
- Levin BE. Synergy of nature and nurture in the development of childhood obesity. *Int J Obes (Lond)* 33, Suppl 1: S53–S56, 2009.
- Malik NM, Carter ND, Murray JF, Scaramuzzi RJ, Wilson CA, Stock MJ. Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. *Endocrinology* 142: 5198–5202, 2001.
- Miralles O, Sánchez J, Palou A, Picó C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity (Silver Spring)* 14: 1371–1377, 2006.
- O'Brien SN, Welter BH, Price TM. Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 695–698, 1999.
- Ossipow V, Laemmli UK, Schibler U. A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 21: 6040–6041, 1993.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4: 2411–2423, 1995.

30. Palou A, Picó C. Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite* 52: 249–252, 2009.
31. Picó C, Oliver P, Sánchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T, Palou A. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 31: 1199–1209, 2007.
32. Pinotti L, Rosi F. Leptin in bovine colostrum and milk. *Horm Metab Res* 38: 89–93, 2006.
33. Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C. Leptin intake during the suckling period improves the metabolic response of adipose tissue to a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* 34: 809–819, 2010.
34. Procaccini C, Jirillo E, Matarese G. Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med* 33: 35–45, 2012.
35. Raver N, Gussakovsky EE, Keisler DH, Krishna R, Mistry J, Gertler A. Preparation of recombinant bovine, porcine, and porcine W4R/R5K leptins and comparison of their activity and immunoreactivity with ovine, chicken, and human leptins. *Protein Expr Purif* 19: 30–40, 2000.
36. Raver N, Vardy E, Livnah O, Devos R, Gertler A. Comparison of R128Q mutations in human, ovine, and chicken leptins. *Gen Comp Endocrinol* 126: 52–58, 2002.
37. Sayed-Ahmed A, Elmorsy SE, Rudas P, Bartha T. Partial cloning and localization of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the Egyptian water buffalo. *Domest Anim Endocrinol* 25: 303–314, 2003.
38. Sayed-Ahmed A, Kulcsár M, Rudas P, Bartha T. Expression and localisation of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow. *Acta Vet Hung* 52: 97–111, 2004.
39. Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Has-sink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1810–1813, 1998.
40. Solomon G, Niv-Spector L, Gonen-Berger D, Callebaut I, Djiane J, Gertler A. Preparation of leptin antagonists by site-directed mutagenesis of human, ovine, rat, and mouse leptin's site. III: implications on blocking undesired leptin action in vivo. *Ann NY Acad Sci* 1091: 531–539, 2006.
41. Stachowiak EK, Oommen S, Vasu VT, Srinivasan M, Stachowiak M, Gohil K, Patel MS. Maternal obesity affects gene expression and cellular development in fetal brains. *Nutr Neurosci* 16: 96–103, 2013.
42. van der Velde M, van der Eerden BC, Sun Y, Almering JM, van der Lely AJ, Delhanty PJ, Smith RG, van Leeuwen JP. An age-dependent interaction with leptin unmasks ghrelin's bone-protective effects. *Endocrinology* 153: 3593–3602, 2012.
43. Yang J, Wang ZL, Zhao XQ, Wang de P, Qi de L, Xu BH, Ren YH, Tian HF. Natural selection and adaptive evolution of leptin in the ochotona family driven by the cold environmental stress. *PLoS One* 3: e1472, 2008.
44. Zhang J, Deng Z, Liao J, Song C, Liang C, Xue H, Wang L, Zhang K, Yan G. Leptin attenuates cerebral ischemia injury through the promotion of energy metabolism via the PI3K/Akt pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 567–574, 2013.
45. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425–432, 1994.



Le clonage de l'ADNc codant la leptine de lapin ainsi que la détermination de sa structure nucléotidique ont permis d'une part, de déduire la structure primaire de la protéine et, d'autre part, de pouvoir la comparer à celle d'autres espèces. Ces comparaisons nous ont permis de développer des sondes nucléotidiques spécifiques de la leptine de lapin. Ainsi, nous avons montré que les ARNm codant la leptine et la protéine étaient présents au niveau de la glande mammaire de lapin pendant la gestation et la lactation. L'analyse quantitative par RT-PCRq a montré que le niveau d'expression des ARNm codant la leptine augmentait à partir de la fin de la gestation pour atteindre un niveau équivalent à celui du tissu adipeux à mi-lactation, période se caractérisant par une forte activité de synthèse et de sécrétion de la cellule épithéliale mammaire. L'analyse de la localisation cellulaire de la leptine, à la fois par hybridation *in situ* et par immunohistochimie, révèle une expression spécifique dans les cellules épithéliales mammaires luminales. Ces résultats suggèrent que la leptine, via un rôle autocrine et/ou paracrine, pourrait constituer un médiateur important dans la régulation locale du développement mammaire.

2. EFFETS COMBINES D'UN LAIT DE MERE T OU OB ET D'UNE ALIMENTATION HYPERLIPIDIQUE ET HYPERGLUCIDIQUE SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE CHEZ LE LAPIN

Dans la première partie de ce travail, nous avons décrit l'expression de la leptine dans la glande mammaire chez la lapine soumise à l'alimentation standard des lapines d'élevage. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet d'une alimentation obésogène sur cette expression. Des travaux entrepris au laboratoire sur le modèle lapin ont montré que de telles altérations nutritionnelles durant la puberté pouvaient avoir un impact sur le développement de la glande mammaire. En particulier, au cours de l'une de ces études, des lapines âgées de 8 semaines (pré-pubères) ont été nourries soit avec un régime enrichi en sucres et en graisses (environ +300 %, régime OB), soit avec un régime témoin (régime T), jusqu'à mi-gestation. Après 10 semaines de régime, le poids des animaux OB était plus élevé. Au 14^{ème} jour de la gestation (mi-gestation), les glandes mammaires des lapines OB présentaient un phénotype anormal. Chez ces animaux, la densité en acini du tissu mammaire était plus élevée que chez les animaux ayant ingéré le régime témoin et leurs canaux mammaires étaient remplis de produits denses, correspondant à une accumulation de protéines du lait et de lipides. Ces résultats montrent que le régime obésogène commencé avant la puberté induit une accélération du développement de la glande mammaire, menant à une accumulation des produits sécrétoires à la mi-gestation (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Cette étude a été la première à être menée chez le lapin. Elle a contribué à illustrer dans cette espèce, le rôle critique de la qualité de l'alimentation sur la croissance de la glande mammaire et sa différenciation.

Au vu de ces résultats, nous avons voulu déterminer les effets à long terme de cette alimentation obésogène via l'étude de la lactation des femelles ayant reçu le régime obésogène avant la puberté ; cette analyse a été poursuivie en évaluant les effets combinés du lait issu de femelles T ou OB et du régime T ou OB administré après le sevrage. Dans un souci de clarté, nous nommerons cette combinaison « effets combinés lait + régime » dans ce mémoire.

2.1. Etude des « effets combinés lait+ régime » sur la croissance des lapins

Afin de s'affranchir des effets *in utero*, seuls les lapereaux issus de mères ayant ingéré le régime T ont été utilisés dans cette étude. A la naissance, ces lapereaux ont été répartis de manière aléatoire sous des nourrices ayant été alimentées avec les régimes T ou OB depuis la puberté, tout en veillant à équilibrer les portées de sorte à avoir 8 lapereaux sous chaque mère. A la naissance, le sexage des lapereaux étant impossible, nous n'avons pas pu équilibrer les portées suivant le sexe des petits. A 8 semaines d'âge, tous les lapereaux ont été alimentés *ad libitum* avec soit le régime obésogène, soit le régime témoin (figure 13).

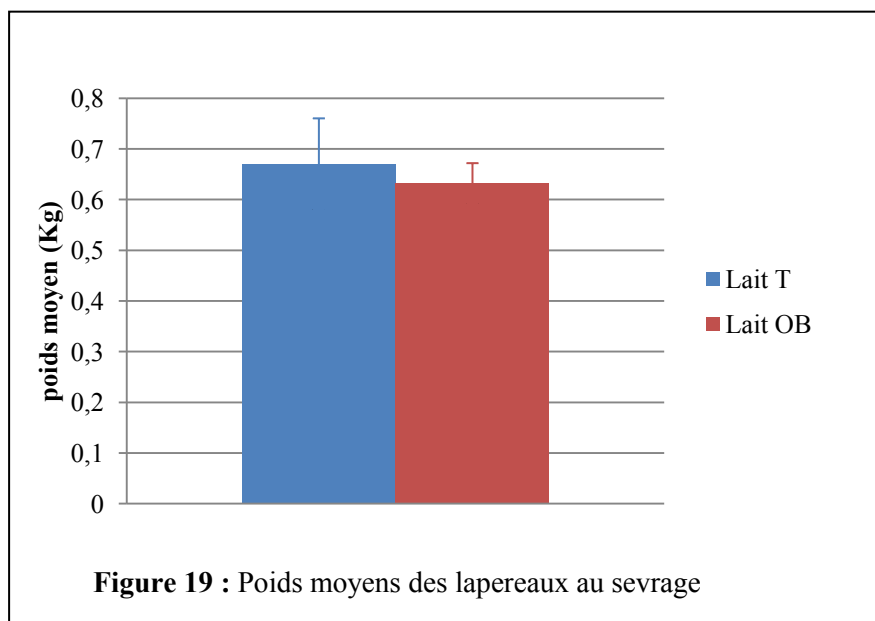
Différents paramètres ont été mesurés aux étapes suivantes :

- poids à la naissance et au sevrage
- à partir du sevrage : croissance par pesée hebdomadaire
- à l'âge de 6 mois : évaluation de la composition corporelle des mâles par scanner iDXA
- à l'âge de 7 mois : dosage des métabolites dans les prélèvements sanguins et évaluation de la composition corporelle des femelles par scanner iDXA

2.1.1. Prise de poids et croissance

2.1.1.1. Au sevrage

Les portées équilibrées de lapereaux issus de mères T, allaités par une mère nourrice alimentée avec le régime T (lait T) ou le régime OB (lait OB), ont été pesées à la naissance et au sevrage. Afin de minimiser les risques sanitaires liés à la manipulation des petits dans le nid, aucune pesée n'a été réalisée au cours de l'allaitement. Ce protocole a permis de minimiser les diarrhées de sevrage. A la naissance les poids moyens des petits nés de femelles T ne différaient pas d'une portée à l'autre ($P > 0,1$). Une distribution aléatoire a été réalisée afin d'équilibrer les portées à 8 petits par femelle nourrice, correspondant à un poids moyen de portée de $56,2 \pm 2,1$ g.



Au sevrage, les petits ayant reçu des laits T (n=40) ou OB (n=32) ont été pesés, afin de déterminer l'effet du lait sur la croissance. La figure 19 montre qu'il n'y a pas de différence significative entre le poids moyen des lapereaux nourris avec le lait T et celui des lapereaux nourris avec le lait OB, suggérant ainsi que l'allaitement par un lait T ou OB n'influe pas sur la croissance des lapereaux jusqu'au sevrage.

A partir du sevrage, les lapereaux ont été sexés et alimentés avec un aliment « bébé » pendant 3 semaines afin de limiter les diarrhées de sevrage dues à un changement brutal d'alimentation. A 7 semaines d'âge, les lapereaux ont reçu pendant une semaine une alimentation mixte composée de 50% d'aliment bébé et de 50% d'aliment T ou OB. A 8 semaines d'âge, les lapins allaités avec le lait T (13 femelles et 11 mâles) et ceux allaités avec le lait OB (12 femelles et 14 mâles) ont été alimentés soit avec le régime T, soit avec le régime OB (Figure 13).

2.1.1.2. A partir du sevrage

Les courbes de croissance ont été réalisées pour chaque sexe en fonction du régime et en fonction du lait ingéré.

Lorsque seul le paramètre « régime » a été pris en considération, la prise de poids hebdomadaire n'était pas différente entre les groupes régime T et régime OB et ce, quel que soit le sexe des lapins (

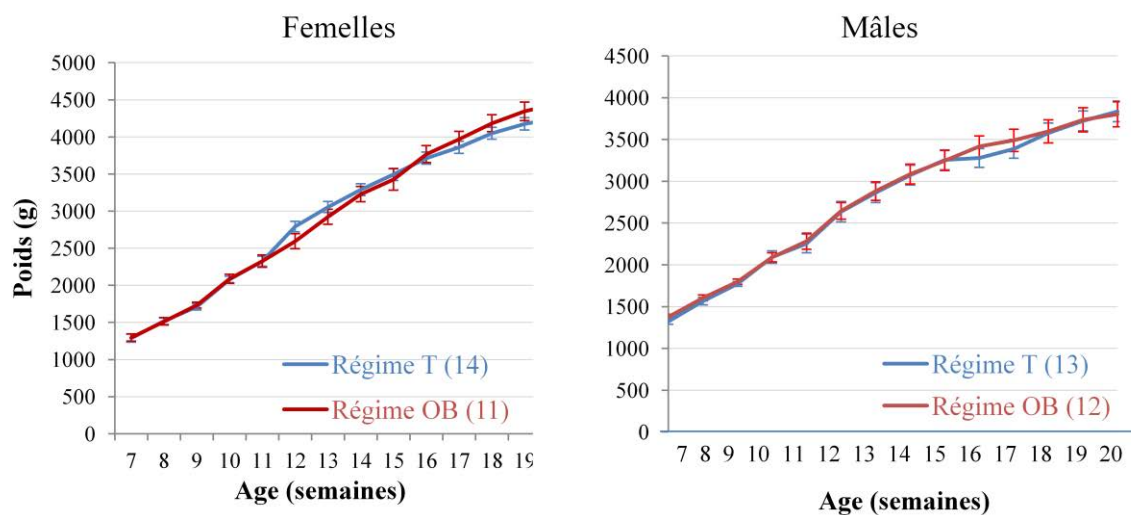


Figure 20) En revanche, en fonction de l'origine du lait ingéré, et

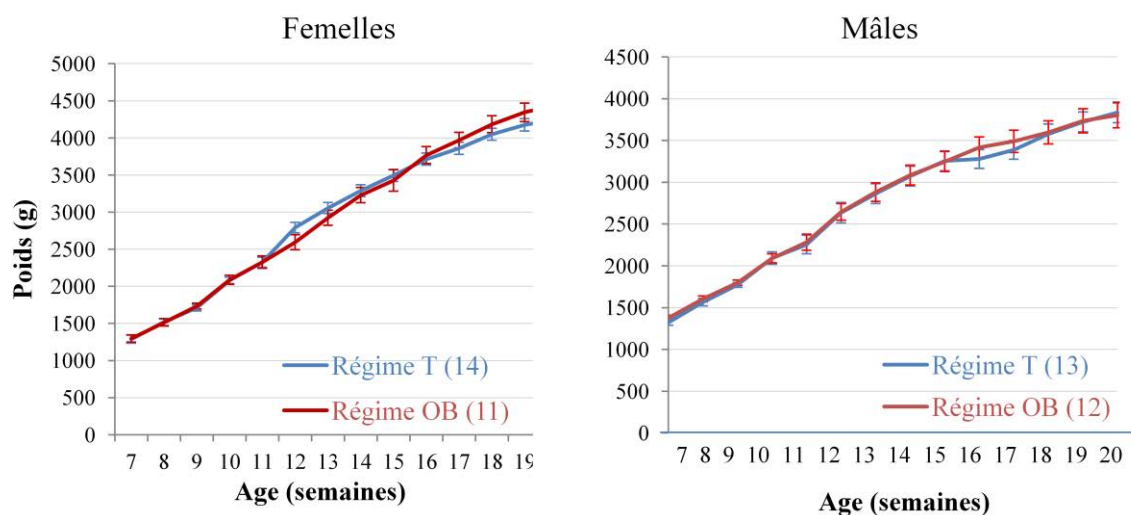


Figure 20 : Croissance à partir du sevrage des femelles et des mâles issus de mères nourries avec le régime témoin, en fonction du régime ingéré en post sevrage

T : témoin ; OB : obésogène. Le nombre d'animaux est indiqué entre parenthèses

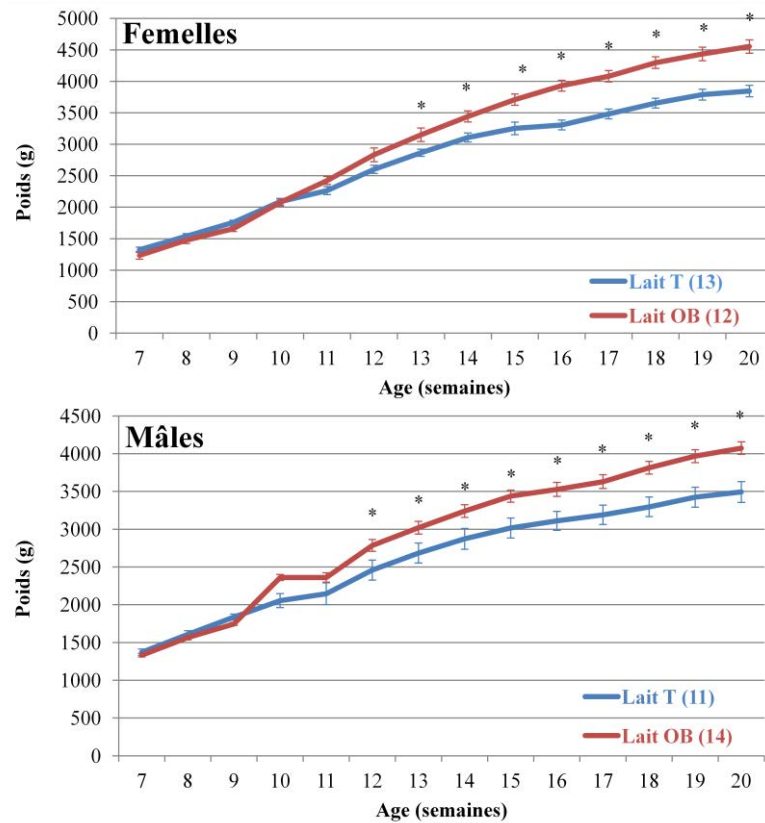


Figure 21 : Croissance des femelles et des mâles issus de mères nourries avec le régime témoin en fonction du lait ingéré en période néonatale

L'astérisque désigne une différence significative entre les groupes ($p \leq 0.05$).

indépendamment du régime consommé, la croissance des lapins, aussi bien femelles que mâles est augmentée avec le lait OB de manière significative (figure 21).

2.1.2. Composition corporelle

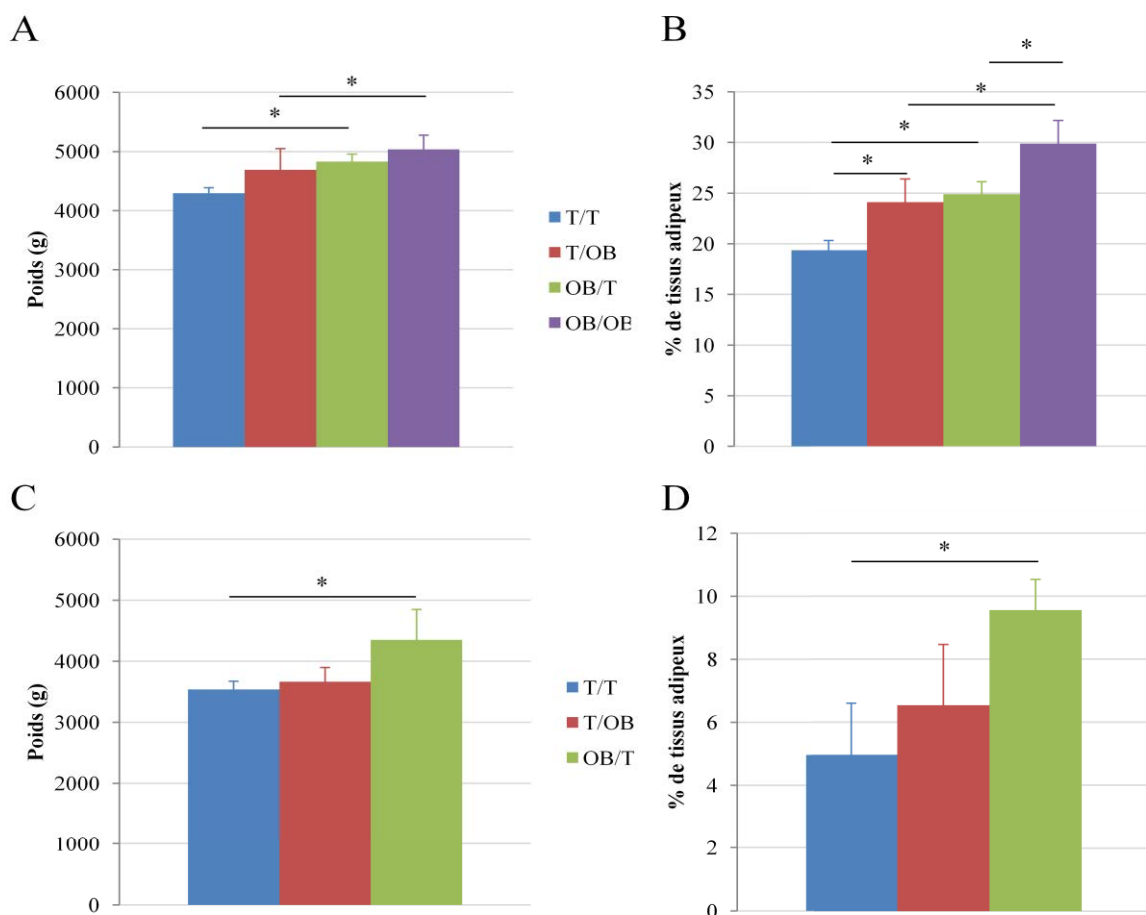


Figure 22 : Poids et adiposité des lapins allaités avec un lait issu de femelles nourries avec le régime témoin ou le régime obésogène et nourris avec ces mêmes régimes après le sevrage

L'effet du lait et/ou du régime sur le poids (A et C) et l'adiposité totale (B et D) des lapines « Lait + régime » à 7 mois (A et B) et des mâles (C et D) à 6 mois a été apprécié après analyse iDXA des animaux. Les 4 groupes correspondent aux 4 combinaisons lait/régime.

L'astérisque désigne une différence significative entre les groupes ($P \leq 0.05$).

L'analyse de la composition corporelle des lapins soumis à un lait T ou OB, puis à un régime T ou OB, confirment l'influence du lait sur la prise de poids des lapins à l'âge adulte, puisqu'on observe chez les mâles, dès 6 mois d'âge et chez les femelles dès 7 mois d'âge, une augmentation importante du poids dans le groupe des lapins nourris avec un lait OB. Cette différence est significative aussi bien dans le cas des mâles soumis à un régime T (T/T 3537 ± 136 g vs OB/T 4348 ± 140 g, $P=0,037$) que dans le cas de femelles, que celles-ci soient alimentées par un régime T ou OB (T/T 4292 ± 97 g vs OB/T 4830 ± 125 g, $P=0,0034$ et T/OB 4690 ± 357 g vs OB/OB 5036 ± 240 g, $P=0,002$).

Cette augmentation du poids s'accompagne d'une augmentation de l'adiposité corporelle totale des mâles et des femelles allaités par un lait OB, par rapport à ceux allaités avec un lait T (pour les mâles T/T $4,96 \pm 1,64\%$ vs OB/T $9,56 \pm 0,97\%$, $p=0,02$; pour les femelles T/T $19,36 \pm 0,96\%$ vs OB/T $24,90 \pm 1,23\%$, $p=0,003$ et T/OB $24,12 \pm 2,28\%$, vs OB/OB $29,88 \pm 2,30\%$, $P=0,05$). Cette différence, également significative si l'on considère l'effet du régime OB qui augmente l'adiposité totale chez les femelles à 7 mois d'âge (T/T $19,36 \pm 0,96\%$ vs T/OB $24,12 \pm 2,28\%$, $P=0,03$ et OB/T $24,90 \pm 1,23\%$ vs OB/OB $29,88 \pm 2,30$, $P=0,03$), mais n'est toutefois pas observée chez les mâles à 6 mois d'âge (T/T $4,96 \pm 1,64\%$ vs T/OB $6,53 \pm 1,93\%$).

2.1.3. Paramètres métaboliques

Le dosage des métabolites sériques a été réalisé sur les lapins nés de mère T, ayant reçu soit un lait T, soit un lait OB et alimentés ensuite par les régimes T ou OB.

La figure 23 montre une triglycéridémie plus élevée chez les lapins ayant reçu un lait OB que chez ceux ayant reçu un lait T, lorsque ceux-ci sont soumis ultérieurement à un régime T (T/T $0,38 \pm 0,04$ g/l vs OB/T $0,50 \pm 0,03$ g/l, $P=0,046$). Cette différence est significative, mais n'est néanmoins pas observée lorsque les lapins sont soumis à un régime OB (T/OB $0,47 \pm 0,05$ g/l vs OB/OB $0,64 \pm 0,09$ g/l). *A contrario*, la concentration en cholestérol sérique ne diffère pas entre les individus allaités par des laits T ou OB, quel que soit le régime ultérieur. Cependant on observe une augmentation du cholestérol sérique entre les régimes T et OB uniquement chez les lapins ayant été nourris avec un lait OB durant la période néonatale (OB/T $0,24 \pm 0,03$ g/l vs OB/OB $0,36 \pm 0,05$ g/l, $P=0,013$). Concernant la glycémie à jeun, aucune différence n'est observée quelle que soit la nature du lait ou du régime consommés (T/T $1,64 \pm 0,08$ g/l, OB/T $1,70 \pm 0,09$ g/l, T/OB $1,78 \pm 0,06$ g/l, OB/OB $1,64 \pm 0,23$ g/l).

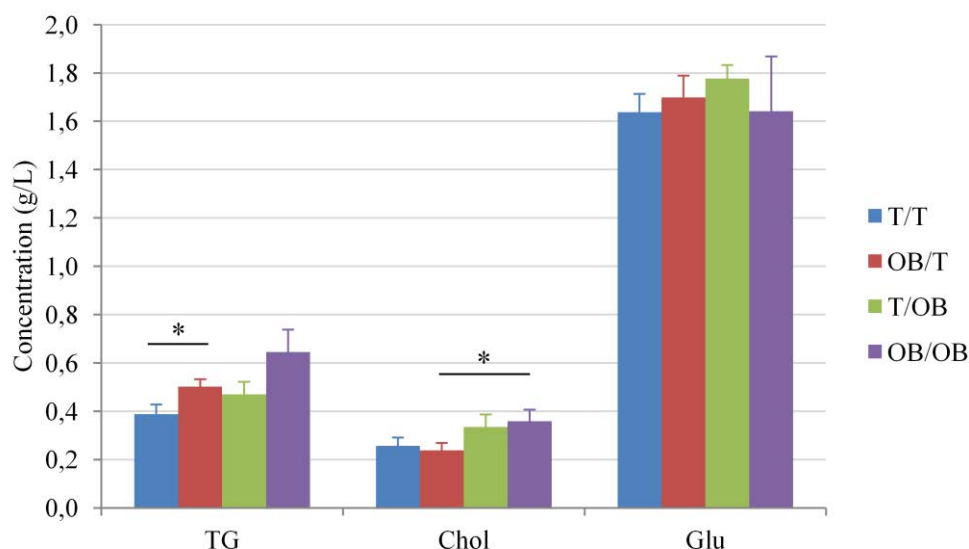


Figure 23 : Dosages des triglycérides, du cholestérol et de la glycémie à jeun chez les lapines à 7 mois d'âge

Les 4 groupes correspondent aux 4 combinaisons lait/régime.

L'astérisque désigne une différence significative entre les groupes ($P \leq 0.05$).

2.1.4. Discussion

L'étude des effets combinés du lait de femelles T ou OB et d'un régime T ou OB, administré après le sevrage, a été réalisée sur des lapereaux nés de mères T, afin de s'affranchir de l'effet *in utero* et de pouvoir ainsi évaluer l'impact du lait, seul ou associé à un régime. Ce travail a montré que le lait n'influe sur le poids moyen des petits ni pendant la période néonatale, ni pendant la période allant jusqu'au sevrage. En revanche, la consommation d'un lait OB pendant la période néonatale induit une augmentation importante et significative du poids à l'âge adulte. Cette augmentation est observée aussi bien chez les mâles que chez les femelles après 6 à 7 semaines de régime et ce, quel que soit le régime administré. La prise de poids des individus allaités par un lait OB est associée à une augmentation de l'adiposité corporelle totale, mesurée à 6 mois d'âge chez les mâles et à 7 mois chez les femelles. Nous avons précédemment décrit une augmentation de l'adiposité chez des lapines alimentées avant la puberté avec un régime OB, lorsqu'elles étaient comparées à des lapines alimentées avec un régime T (Hue-Beauvais *et al.* 2011). L'augmentation de l'adiposité corporelle totale induite

par l'allaitement avec un lait OB est toutefois plus importante que celle induite par la consommation du régime OB seul. Ce travail montre également des modifications des paramètres métaboliques à l'âge adulte : en particulier, la concentration en triglycérides plasmatiques est augmentée chez les lapins nourris avec un lait OB par rapport à ceux nourris avec un lait T. De la même manière, cette concentration est accrue lorsque les animaux sont nourris avec le régime OB, confirmant des résultats similaires obtenus chez des lapins mâles alimentés avec un régime enrichi en graisses et en sucres (Helfenstein *et al.* 2011). Nos résultats sont les premiers à montrer les effets à long terme à l'âge adulte de la consommation d'un lait OB, sur la concentration sérique en triglycérides, puisqu'une étude récente n'a pas mis en évidence cette différence, à 3 mois d'âge, chez des rats nourris avec un lait de type « cafétéria » (Gugusheff *et al.* 2013). Nous avons de plus observé une augmentation du taux plasmatique de cholestérol chez les lapins consommant le régime OB, associée à la consommation d'un lait OB. Nos résultats illustrent une relation complexe entre l'alimentation et l'induction d'une adiposité corporelle excessive qui peut être associée de manière causale ou concomitante avec des variations métaboliques à long terme.

De nombreuses études rapportent l'induction d'une obésité dans différents modèles animaux (singes, porcs, chiens, hamsters, souris...), par l'utilisation de régimes dont la composition en graisses est variable, mais souvent proche de 40% de l'énergie totale ingérée (Buettner *et al.* 2007). Cependant chez l'homme, une augmentation de la teneur en graisses dans l'alimentation s'accompagne souvent d'une augmentation de la teneur en sucres. Mimant un régime alimentaire humain, des régimes obésogènes à teneur élevée en sucres et en graisses ont été utilisés dans des modèles animaux. L'administration d'un tel régime (30% de sucres et 11% de graisses) à des lapins mâles adultes, induit une importante augmentation du poids et de l'adiposité corporelle totale, mais modifie peu des paramètres métaboliques tels que le cholestérol et les triglycérides (Zhao *et al.* 2008). Ces régimes, dont les compositions en sucres et en graisses sont plus importantes que celle du régime utilisé lors de notre étude (respectivement 7.7% et 13%), induisent des effets similaires à ceux que nous avons obtenus concernant l'adiposité des animaux. Toutefois, dans ces modèles, l'augmentation du poids des mâles est plus importante que celle que nous observons chez les femelles. Ceci suggère que les effets des divers régimes obésogènes sur la croissance des lapins peuvent être imputés soit à un dimorphisme sexuel important dans l'espèce, soit à la variation entre les teneurs en graisses des régimes. Les résultats observés chez les lapines sont à rapprocher de ceux

observés chez la femme où la relation entre l'obésité et la composition en sucres et en graisses de l'alimentation a été démontrée dans plusieurs études cliniques (Tucker & Kano 1992).

Les fenêtres nutritionnelles durant lesquelles l'alimentation obésogène pouvait avoir un effet important sur le développement, ont également été étudiées. Des travaux, réalisés chez le rat, montrent l'importance de la nutrition durant la période allant du début de la gestation jusqu'à la fin de la lactation. Si la comparaison des phénotypes de la descendance, induits par l'administration d'un régime hypergras, démarré soit avant la conception, soit au début de la gestation et poursuivi jusqu'à la fin de la lactation, montre un phénotype anthropométrique identique, des différences d'expression importantes de gènes impliqués dans des mécanismes de régulation ont pu être mises en évidence (Howie *et al.* 2013). De plus, une étude, également réalisée chez le rat, a montré différents effets de l'exposition maternelle à une alimentation obésogène durant les périodes natale et néonatale, sur la régulation de la prise alimentaire, le poids corporel et l'adiposité corporelle à l'âge adulte de la descendance. L'allaitement par un lait de mère nourrie avec un régime obésogène, indépendamment du régime administré ultérieurement, induit une prédisposition à l'obésité chez les femelles malgré une prise alimentaire comparable à celle des animaux témoins (Gugusheff *et al.* 2013). Nos résultats confirment ces données, puisque nous avons montré que chez le lapin la consommation d'un lait OB induit une augmentation de poids et une hyperadiposité à l'âge adulte. Cependant, contrairement au rat (Gugusheff *et al.* 2013), le lapin, ne présente pas de dimorphisme sexuel lorsqu'on observe des effets d'un lait OB. La spécificité des espèces, en particulier la régulation de leur métabolisme, ainsi que la spécificité des régimes constituent des pistes afin d'expliquer ces différences.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'être nourri pendant la période prénatale et/ou néonatale par une alimentation « équilibrée » qualitativement et quantitativement pourrait rendre un individu moins sensible au gain de poids et à l'adiposité, induits par l'alimentation ultérieure. Bien sûr, cet effet « bénéfique » pourrait être contrecarré dans le cas de consommation persistante d'une alimentation hypercalorique durant la vie adulte.

Au-delà des effets anthropométriques d'un régime obésogène, nos travaux ont également montré l'existence d'effets métaboliques dus à cette alimentation. Le lapin a déjà fait l'objet d'études destinées à mettre en évidence des désordres du métabolisme lipidique induits par l'obésité, elle-même causée par l'administration d'une alimentation riche en graisses (Prior *et*

al. 2010; Picone *et al.* 2011). Des études réalisées dans cette espèce et utilisant un régime obésogène, ont mis en évidence, outre une importante prise de poids, une augmentation des triglycérides plasmatiques et l'existence de lésions artérielles importantes, de type athérosclérose, après quelques mois de régime, causées par une altération du métabolisme lipidique (Yin *et al.* 2002). Nos résultats confortent l'intérêt du lapin comme modèle nutritionnel et biomédical pouvant permettre l'identification de facteurs qui contribueraient à l'obésité et à certaines dérégulations métaboliques associées.

2.2. Etude des « effets combinés lait+ régime » sur le phénotype mammaire à 8 jours de gestation : Publication 2

Les conséquences d'une adiposité élevée sur la lactation et la composition du lait avaient été étudiées sur les deux groupes de lapines ayant reçu le régime OB ou T avant la puberté, puis tout au long de leur vie jusqu'en lactation. L'influence de ce lait sur le phénotype mammaire a été évaluée en étudiant les lapereaux qui, après la mise-bas, ont été répartis de manière aléatoire sous les deux groupes de lapines nourries T et OB.

Milk from dams fed an obesogenic diet combined with a high-fat/high-sugar diet induces long-term abnormal mammary gland development in the rabbit

Cathy Hue-Beauvais*, Emmanuelle Koch*, Pascale Chavatte-Palmer^{#*}, Laurent Galio*, Sophie Chat*, Martine Letheule*, Delphine Rousseau-Ralliard[#], Florence Jaffrezic*, Denis Laloë*, Etienne Aujean*, Françoise Révillion[§], Valérie Lhotellier[§], Arie Gertler[†], Eve Devinoy*, Madia Charlier*

Journal of Animal Science: soumis

Milk from dams fed an obesogenic diet combined with a high-fat/high-sugar diet induces long-term abnormal mammary gland development in the rabbit

Cathy Hue-Beauvais^{*}, Emmanuelle Koch^{*}, Pascale Chavatte-Palmer^{#†}, Laurent Galio^{*}, Sophie Chat^{*}, Martine Letheule^{*}, Delphine Rousseau-Ralliard[#], Florence Jaffrezic^{*}, Denis Laloë^{*}, Etienne Aujean^{*}, Françoise Révillion[§], Valérie Lhotellier[§], Arie Gertler[†], Eve Devinoy^{*}, Madia Charlier^{*}

Author affiliations

^{*}INRA, UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, F78350, Jouy-en-Josas, France

[#]INRA, UMR1198, Biologie du Développement et de la Reproduction, F78350, Jouy-en-Josas, France

[†] PremUp Foundation, 53 rue de l'Observatoire, 75014 Paris, France

[§]Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret, F59020, Lille, France

[†]Institute of Biochemistry Food Science and Nutrition, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

Corresponding author: Madia Charlier, INRA, UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, F78350, Jouy-en-Josas, France [mail to: madia.charlier@jouy.inra.fr](mailto:madia.charlier@jouy.inra.fr)

Running head: A milk-diet combination alters mammary gland

ABSTRACT

Alterations to the metabolic endocrine environment during early life are crucial to mammary gland development. Among these environmental parameters, the initial nutritional event after birth is the consumption of milk, which represents the first maternal support provided to the mammalian newborns. Milk is a complex fluid that exerts effects far beyond its immediate nutritional value. The present study thus aimed to determine the effect of the nutritional changes during the neonatal and prepubertal periods on the adult mammary phenotype. Newborn rabbits were suckled by dams fed a high-fat/high-sugar obesogenic (**OD**) or a control (**C**) diet and the subsequently fed either the OD, or C diets, from the onset of puberty and throughout early pregnancy. Mammary glands were collected during early pregnancy (Day 8 of pregnancy). Rabbits fed with OD milk and then subjected to an OD diet displayed an abnormal development of the mammary gland: the mammary ducts were markedly enlarged ($P < 0.05$) and filled with abundant secretory products. Moreover, the alveolar secretory structures were disorganized, with an abnormal aspect characterized by large lumen. Mammary epithelial cells contained numerous large lipid droplets and exhibited fingering of the apical membrane and abnormally enlarged intercellular spaces filled with casein micelles. Leptin has been shown to be involved in modulating several developmental processes. We therefore analysed its expression in the mammary gland. Mammary leptin mRNA was strongly expressed in rabbits fed with OD milk and subjected to an OD diet, by comparison with the controls. Leptin transcripts and protein were localised in the epithelial cells, thus indicating that the increase in leptin synthesis occurs in this compartment. Taken together, these findings suggest that early-life nutritional history in particular through milking period can determine subsequent mammary gland development. Moreover, they highlight the potentially important regulatory role that leptin may play during critical early-life nutritional windows with respect to long-term growth and mammary function.

Keywords: mammary epithelial cells; lactation; rabbit; leptin; high-fat/high-sugar diet

INTRODUCTION

Mammary epithelial growth and differentiation are a lengthy process which is tightly modulated throughout development by several hormonal and metabolic signals (Hennighausen & Robinson 2005), suggesting that nutritional status during the major developmental stages of this organ may be of critical importance. Indeed, an increased body growth rate consecutive to high energy feeding reduces mammary epithelial cell proliferation and thus restricts subsequent milk production in cattle (Sejrsen 1994; Sejrsen & Purup 1997; Sejrsen *et al.* 2000; Davis Rincker *et al.* 2008). In rodents, obesity has been shown to affect the chances of a successful lactation by impairing mammary gland morphology and function (Rolls *et al.* 1984). However, the timing and duration of nutritional changes during critical periods may be of importance in terms of exerting differential effects on mammary development and subsequent lactation. In particular, there has been a considerable interest in understanding the importance of the early postnatal period (Koletzko *et al.* 2012), because early-life nutritional events may contribute substantially to the long-term health and disease susceptibility of offspring.

The objective of the present study was therefore to determine the effects of nutrition from birth onwards on the adult mammary phenotype. We therefore used a previously developed rabbit model of dietary induced obesity (high-fat/high-sugar-diet) where we had previously demonstrated alterations of mammary gland development at mid-pregnancy (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Here, we analyse the effects of this obesogenic diet on milk composition. Furthermore, by feeding the pups with this milk and then subjecting them to the same OD diet from puberty and then throughout early pregnancy, we were able to evaluate the effects of the combination of OD milk and an OD diet on mammary development at Day 8 of pregnancy.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Diets and Experimental Design

All animal studies were carried out in accordance with European Community regulations on animal experimentation (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and with the authorization of the French Ministry of Agriculture. The protocol referred to above was approved (visa 12/132) by the COMETHEA Ethics Committee (Comité d'éthique appliqué à l'Expérimentation Animale), registered within the French Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale. The principal investigator's licence number (MC) is 78-119.

The rabbit model has previously been described (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Briefly, twenty females (New Zealand White, 1077-INRA) were housed individually in an indoor facility under controlled temperature (18°C) and light conditions (8 h light/16 h darkness, except for the week before mating when they were kept under 16 h light/8 h darkness) and temperature (18°C). Before puberty, at the age of 8 weeks, the rabbits were randomly allocated to one of two groups: one group (10 females) was fed *ad libitum* with a custom-made standard laboratory diet designed to satisfy their needs (Control diet, **C**), whereas the other group (10 females) was fed a high-fat/high sugar obesogenic diet (**OD**) based on the control diet and adapted from that described by Guo and Jen (1995) (Table 1). Briefly, OD diet was increased in energy levels (+18% compared to the C diet) and supplemented with lard (60 g/kg, +276% fat compared to the C diet) and beet sugar (100 g/kg, +269% carbohydrates compared to the C diet). At 24 weeks of age, the C and OD females were both mated with six control males and continued to receive the assigned diets throughout pregnancy and lactation. At birth, litter size and weights were measured in each group.

Following birth, female pups born to C dams were randomly fostered to a C or OD dam. The litters were adjusted to 8 female C pups per in each group to ensure standardised nutrition during suckling. Milk production was estimated twice a week by the difference between pre- and post-suckling weights of the pups, and did not differ significantly between the two groups of foster mothers. Milk samples were obtained on Day 16 of lactation by hand stripping. Briefly, conscious does were laid on their back or on their side and the mammary glands were gently squeezed to expulse milk. Collected milk samples were stored at -20°C before analysis. At weaning (4 weeks of age), the female offspring were housed two per cage and fed a standard post-weaning chow for rabbit pups (Stabiva, Agralys Thoreau, France) for 4 weeks. At 8 weeks of age, they were housed individually and assigned randomly to receive either the C or OD diets (Fig. 1). Four groups, each containing 8-10 female pups, were thus formed and named according to the lactating mother (C or OD as the first letter for C or OD-dams, respectively) and the post-weaning diet (C or OD as the second letter). Adiposity was measured *in vivo* at 16 weeks of age using total body electrical conductivity (**TOBEC**), as already validated in rabbits (Fortun-Lamothe 2006). At 24 weeks of age, the animals were mated and then sacrificed at day 8 of pregnancy. The left lower mammary gland from each animal was excised and dissected. Mammary epithelial tissue and surrounding mammary adipose tissue were either processed for histology or snap-frozen and stored for later RNA isolation, immunohistochemistry and *in situ* hybridisation.

Analysis of the Fatty Acid Composition of Dams Milk

Two hundred μ l of milk were used to determine fatty acid (FA) composition. After addition of an internal standard (margaric acid, C17:0), lipids were extracted with chloroform/methanol (2/1) (adapted from the method of Folch and Lees) (Folch *et al.* 1957). Once extracted, and without any drying to prevent the loss of medium-chain volatile fatty acids, the fatty acids were transmethyated with 7% Boron trifluoride methanol (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) according to the method described by Morrisson *et al.* (Morrison & Smith 1964). The methyl esters of plasma fatty acids were analysed by gas chromatography coupled to FID (Auto Sampling 8410 Gas Chromatograph 3900; Varian, Les Ulis, France) on an Econo-Cap EC-WAX capillary column (30m, 0.32mm internal diameter, 0.25 μ m Film, ref 19654, ALLTECH Associates Inc, Templemars, France), as described (Rousseau *et al.* 2003).

Histological Analyses

For all histological, immunohistological and *in situ* hybridisation analyses, the mammary samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at 4°C. The samples were then cryoprotected in 40% sucrose, embedded in TissuTek (Sakura, Torrance, CA), and kept in liquid nitrogen before storing at -80°C. Five-micrometer sections, at least 100 μ m apart, were mounted on slides. For histology, the slides were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and then either examined under bright light microscopy or digitalised using a Hamamatsu nanozoomer (Tokyo, Japan). The latter technique enables observation of the entire section. Five sections per rabbit were processed and the images were analysed using both the Hamamatsu Nanozoomer Digital Pathology Virtual Slide Viewer and ImageJ software (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Areas occupied by mammary epithelial tissue, adipose tissue, mammary ducts or connective tissue were measured and quantified using one-step stereology (Reed *et al.* 2010) with Mercator software (ExploraNova, La Rochelle, France).

For immunohistological analyses, 5 μ m-thick frozen sections were treated with 50 mM ammonium chloride for 30 min followed by permeabilisation in 2% bovine serum albumin (BSA), 0.05% saponin and 0.05% sodium azide in phosphate buffer saline (PBS) 1X for 1h. The tissue sections were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in the same buffer. The primary antibodies were goat polyclonal anti-rat leptin (1 : 100, AbD Serotec, UK) and mouse monoclonal anti-cytokeratin 8 (CK8; 1 : 100, Covance, France), respectively. After washing, antibody binding was visualised after incubation for 45 min with fluorescence-labelled secondary antibodies (anti-goat TRITC-conjugated or anti-mouse TRITC-conjugated 1:300, Jackson ImmunoResearch, PA) in PBS 1X. 4,6-diamidino-2-

phenylindole (**DAPI**) was diluted to 1 : 500 in PBS 1X and applied for 3 min. at room temperature as a nuclear counter-stain. The secondary antibody control slides were treated like the others, but with the omission of the primary antibodies. As a control, the primary goat anti-rat leptin antibody was incubated for 1h at room temperature with recombinant rabbit leptin in an excess quantity (3-fold), before treatment. The slides were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and observed with a Zeiss microscope coupled with ApoTome technology at the MIMA2 facilities (INRA, F78350 Jouy-en-Josas, France). The specificity of the immunolabelling technique was assessed by incubating the slides with a secondary antibody alone.

For *in situ* hybridisation (**ISH**) experiments, LNA-modified DNA probes were synthesized by Eurogentec (France). The sequences of the LNA-modified oligonucleotides (LNA-modified bases are indicated in upper case) were as follows: leptin probe: 5'-gCccTatCcgTccTgtGttCc-3'; non-specific antisense probe: 5'-gGaaCacAggAcgGatAggGc-3'. One hundred pmoles of leptin and antisense control LNA-probes were DIG-labelled using the 3' terminal transferase labelling kit (Roche, France) for 30 min. at 37°C. The *in situ* hybridization protocol was performed as previously described (Galio *et al.* 2012). Leptin probe specificity was assessed in all groups using an antisense oligonucleotide LNA probe.

Ultrastructural Analyses of Mammary Tissue

For electron microscopy, mammary tissues were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M Na cacodylate buffer pH 7.2, for 4 hours at room temperature, and then postfixed with 1% osmium tetroxide containing 1.5% potassium cyanoferrate, contrasted with uranyl acetate 2% in water, gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%), and embedded in Epon. One-micron sections were collected onto glass slides, and counter-stained with methylene blue-Azur II. Sections were imaged on an epifluorescence microscope (DMRB – Leica - France) using a 63x plan apochromat oil immersion lens. Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids, and counter-stained with lead citrate before being examined with a Zeiss EM902 electron microscope operating at 80kV at the MIMA2 facilities (INRA, F78352 Jouy-en-Josas, France, www6.jouy.inra.fr/mima2). Microphotographs were acquired using a charge-coupled device camera MegaView III and analysed with ITEM software (Eloïse, France).

Quantitative RT-PCR of Rabbit Leptin mRNA from Mammary Epithelial and Adipose Tissues

Total RNA from mammary epithelial and adipose tissues was isolated from 1 g of each sample by Trizol extraction according to the manufacturer's protocol (Invitrogen,

France). RNA integrity (**RIN**: RNA integrity number) was assessed using an Agilent Bioanalyzer (average RIN of 9 for all samples) with a cut-off value of 8. The RNA samples were then stored at -80°C until further analysis.

The primers and the TaqMan Minor Groove Binder (**MGB**) fluorogenic probe used for leptin were selected according to the findings of previous experiments (Koch *et al.* 2013) and had the following sequences: sense primer 5'-CACACGCAGTCGGTCTCCT-3', antisense primer 5'-GTTTGGACTTCATCCCTGGC-3', and probe 5'-CAGACAGAGGGTCGTC-3' (GenBank accession no KC461185). In order to take account of variations in RNA quantity and quality, leptin expression was normalised to a housekeeping gene. The NormFinder program (Andersen *et al.* 2004) was used to assess the variability of three candidate endogenous genes, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (**GAPDH**), TATA binding protein (**TBP**) and Pumilio homolog 1 (**PUM1**) genes. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was the gene with the most stable expression in all groups of animals at the same stage of mammary gland development and was therefore used as the reference gene during this study. Leptin gene expression was thus expressed as a ratio using the selected reference gene, namely GAPDH. The sequences of the primers and TaqMan MGB probe (Applied Biosystems, UK) used for GAPDH were as follows: sense primer 5'-AGTGCTAGCGCGTCCCC -3', antisense primer 5'-GGATTGCGCCGATTGG-3', and probe 5'- TGGTGAAGGTCGGAGTGA -3'.

Reverse transcription and PCR were performed in a one-step method on 100 ng of total RNA using a LightCycler 480 Real Time PCR System (Roche Diagnostics, France) as previously described (Koch *et al.* 2013). The relative quantification of target gene expression was achieved using the comparative cycle threshold method (C_T) (Applied Biosystems, User bulletin no 2, Relative quantification of gene expression; 1997), where the C_T variable is defined as the cycle number at which the fluorescent signal generated by cleavage of the dual labelled probe can first be detected. The mammary gland at 8 days of pregnancy from a C/C rabbit was chosen as the calibrator sample (i.e. target expression = 1) because preliminary data showed a moderate level of leptin expression. The relative target expression was given using the equation described by Livak et al (2001) as follows: $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ sample - ΔC_T calibrator sample, with $\Delta C_T = C_{T\text{ TARGET}} - C_{\text{GAPDH}}$.

Statistical Analyses

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (**SEM**). The effects of the milk/diet combination on histological (stereology) and on leptin mRNA (RT-qPCR) expression in the mammary gland were assessed by the non-parametric Mann Whitney U test

using StatE1 software (AD Science). *P* values of < 0.05 were considered as statistically significant.

When necessary, statistical analyses were supplemented by an ANOVA approach, using the “aovp” function of the “ImPerm” package (<http://CRAN.R-project.org/package=ImPerm>). This approach is analogous to a conventional ANOVA except that *p*-values are obtained by pairwise permutation of the data rather than being derived from *F*-tests. The use of permutation ANOVA is particularly suitable for datasets with relatively few replicates and ensures robust tests with respect to violated classical ANOVA assumption (homoscedasticity and normality).

RESULTS

Fatty Acid Profiles in C and OD Milks

In order to evaluate OD diet-induced alterations in milk composition, the fatty acid (FA) profiles were determined in milk from C and OD dams at 16 days of lactation (Table 2). The total FA content was greater in OD milk (84.5 ± 5.00 g/l) than in control milk (52.4 ± 3.84 g/l, *P* = 0.0012), but both milks exhibited similar total saturated fatty acid (SFA) contents (*P* = 0.0939). In contrast, long chain (**lc**) C16:0 and C18:0 FA levels were greater in OD milk (*P* = 0.0012 and *P* = 0.0003, respectively), whereas medium chain (**mc**) FA concentrations were lower when compared to C milk (*P* = 0.1868). A sharp rise in the monounsaturated fatty acid (**MUFA**) content (*P* = 0.0003) was observed in OD milk, with a corresponding increase in oleic acid (*P* = 0.0003). Polyunsaturated fatty acid (**PUFA**) levels were also greater in the OD milk (*P* = 0.0022), which exhibited a slight increase in the PUFA n-6 / n-3 ratio (*P* = 0.0140). Qualitatively, SFA were the main FA present in both OD and C milk FA profiles. However mc SFA levels decreased while lc SFA levels rose in OD milk (*P* = 0.0003 and *P* = 0.0003, respectively). MUFA were present at greater levels in OD milk (28.6 ± 1.25 vs. 13.4 ± 1.40 % in C milk, *P* = 0.0003) with more oleic acid (24.0 ± 0.97 vs. 10.5 ± 0.90 % in C milk, *P* = 0.0003).

Litter size and body weight at birth

At birth, the number of pups per doe did not differ significantly between the C and OD groups (Fig. 2A), nor did the pup weight (Fig. 2B).

Adiposity and Metabolic Parameters of the Offspring

Body fat mass measurements at 16 weeks of age only revealed a significant increase in body adiposity as a function of the post-weaning diet (7 ± 0.14 % in OD diet-fed rabbits vs. 6 ± 0.28 % in C diet-fed females, *P* = 0.02). Triglyceride concentrations in peripheral blood at 4

months of age were significantly greater in OD diet-fed rabbits (1.55 ± 0.36 g/l) when compared to C diet-fed animals (0.69 ± 0.09 g/l, $P < 0.05$).

Histological Analysis of Mammary Gland of the Offspring

In order to determine whether the consumption of milk from OD diet-fed mothers, associated or not with post-weaning OD diet, induced morphological changes in the mammary phenotype on Day 8 of pregnancy, histological examinations of thin mammary tissue sections were performed (Fig. 3) and evaluated by stereology (Fig. 4), which yields quantitative results in a three-dimensional structure using observations made using two-dimensional samples (Reed *et al.* 2010).

The clearest morphological modifications were observed in the OD milk and OD diet-fed (**OD/OD**) group. Indeed, all OD/OD mammary glands were characterized by a marked enlargement of the mammary ducts filled with abundant secretory products, together with disorganized alveolar secretory structures and abnormally large and filled lumen (Fig. 3A).. Moreover, related to the OD diet, a marked increase in mammary adipose tissue was observed in both the OD/OD and the C milk and OD diet-fed (**C/OD**) groups, and sparse alveolar secretory structures were observed within the fat pad of OD/OD and C/OD animals when compared to C milk and C diet-fed (**C/C**) or OD milk and C diet-fed (**OD/C**) females (Fig. 3B).

Stereological analysis of the mammary glands from the four groups of rabbits confirmed these observations. A significant increase in the relative percentage of mammary adipose tissue and mammary ducts was observed in OD/OD animals when compared to C/C controls ($42.89 \pm 5.62\%$ and $8.57 \pm 2.50\%$, vs. $28.55 \pm 3.93\%$ and $2.90 \pm 0.46\%$, in OD/OD and C/C, respectively; $P < 0.05$). The proportion of mammary adipose tissue was also greater in the C/OD, and OD/C groups versus C/C ($P < 0.05$). Although the mammary ducts appeared to be larger in OD/C rabbits compared to C/C, (Fig.4), stereological analyses revealed no difference in ductal areas between the two groups. A significant decrease in the relative volume of connective tissue could only been observed in the OD/OD group when compared to the C/C group ($33.75 \pm 5.20\%$ vs. $46.94 \pm 4.25\%$; $P < 0.04$), whereas the relative proportion of epithelial tissue was decreased in the C/OD ($11.10 \pm 1.30\%$), OD/C ($13.87 \pm 2.56\%$) and OD/OD ($14.78 \pm 2.08\%$) groups when compared to C/C ($21.62 \pm 1.39\%$, $P < 0.02$) (Fig. 4).

Ultrastructural Analysis of Mammary Gland of the Offspring

Electron microscopy analysis also revealed morphological features that differed as a function of the milk/diet combination. While mammary epithelial cells were weakly differentiated on Day 8 of pregnancy in C/C rabbits (Fig. 5A), the OD/C group displayed a mix of features, with several layers of mammary epithelial cells (MEC) like the C/C group but enlarged lumina (OD/OD group) filled with cellular remains (Fig. 5B) that were more reminiscent of the differentiated mammary gland during lactation.

The mammary epithelial cells surrounding the lumen in C/OD and OD/OD females contained numerous large lipid droplets (**LD**, Fig. 5C-D). The lumina, which were open in the OD/OD group (Fig. 5D-E), contained a large quantity of easily recognizable casein micelles as well as large fat globules (**FG**) buried in a fibrillar material. Moreover, the intercellular spaces were abnormally enlarged and filled with casein micelles (arrows, Fig. 5E). At high magnification, mammary epithelial cells surrounding the lumina displayed numerous microvilli at the apical membrane. In the OD/OD group, the apical membrane appeared to be stretched and presented only a few microvillus-like structures (Fig. 5G), while numerous microvilli characterized the apical membrane of epithelial cells in the C/C mammary glands (Fig. 5F).

Quantitative Analysis of Mammary Leptin mRNA of the Offspring

The above results show that pups fed OD milk and/or OD diet had a greater proportion of adipose tissue in the mammary gland. This gland is a complex tissue in which both adipose and epithelial tissues may be a source of leptin. In order to assess milk and/or diet effects on local leptin synthesis, quantitative RT-PCR was performed on mammary epithelial tissue from each rabbit at day 8 of pregnancy (Fig. 6). No significant differences were observed between the C/C, C/OD and OD/C groups (Leptin/GAPDH ratios of 5.49 ± 1.55 , 10.85 ± 3.40 and 8.63 ± 1.46 , respectively). These values were significantly lower than those found in adipose tissue (52.85 ± 18.02 , $P < 0.05$) used as a positive control. However, OD milk associated with an OD diet revealed the presence of greater levels of mammary leptin (40.48 ± 15.39 , $P < 0.05$) as compared to any other group, which were comparable to those measured in adipose tissue.

Cellular Localization of Leptin mRNA and Protein in the Mammary Gland of the Offspring

In order to determine the cellular origin of the mammary leptin mRNA content and the putative changes induced by milk and/or diet, *in situ* hybridisations (ISH) were performed in all four groups using a digoxigenin-labelled oligonucleotide LNA probe on rabbit mammary gland sections at day 8 of pregnancy (Fig. 7). During the early stages of pregnancy, stromal tissue containing adipocytes is predominant in the mammary gland. Since this study was

focused on the secretory epithelium, cryosections were used in order to minimise leptin signals due to adipocytes. Mammary adipocytes were therefore only lightly labelled, whereas a clear signal was observed in the alveolar compartment in all four groups. Even though this technique is not fully quantitative, the leptin signal was much weaker with a similar labelling and exposure time in the C/C (Fig. 7A), C/OD and OD/C groups (data not shown) when compared to the OD/OD group (Fig. 7C).

To verify whether the increased expression of leptin mRNA in the OD/OD group was mirrored at the protein level, cryosections of mammary glands collected on Day 8 of pregnancy were analysed by indirect immunofluorescence using an anti-leptin antibody (Fig. 8A-D). Very few acini were labelled in C/C animals (Fig. 8A), while strong labelling could be observed in disorganized mammary structures in the OD/OD group. Moreover an accumulation of leptin was detected in the lumina of enlarged epithelial structures in the OD/OD group (Fig. 8D). In the OD/C and C/OD groups, the leptin signal was detectable although weak, being similar to that observed in C/C animals (Fig. 8B and C). Cytokeratin 8 immunostaining was used to stain the epithelial cells in the aforementioned mammary structures (Fig. 8E-H). Cells strongly stained with CK8 antibody were detected in C/C (Fig. 8E) mammary glands and altered structures were found in OD/OD (Fig. 8F) mammary glands, thus demonstrating the persistence of mammary epithelial cells in these structures.

DISCUSSION

This study reveals the effects on mammary gland development during early pregnancy (Day 8) that were induced in rabbit pups consuming milk from obesogenic-diet fed dams, and fed an obesogenic diet from the post-weaning period. Suckling from OD-fed dams appeared to markedly impair mammary development when combined with an obesogenic diet introduced before puberty. At Day 8 of pregnancy, the rabbit mammary gland has entered a proliferative stage of growth (Denamur 1963b). The mammary tissue of OD/OD animals exhibited disorganized alveolar secretory structures and abnormally enlarged ducts filled with abundant secretion products. An abnormal fingering of the apical membrane, an abnormal presence of fibrillar material and enhanced secretory phenotype in the lumina of epithelial cells (abnormal fingering) as well as abnormal filling of intercellular spaces with casein micelles were observed. To our knowledge, this study is the first to report that mammary gland development is dependent upon both neonatal nutrition, through milk, and postweaning obesogenic diet introduced at puberty.

These observations underscore the importance of considering the early life nutritional environment as contributing to later life mammary development. The importance of the *in utero* period alone in determining a subsequent phenotype has been demonstrated in several animal models (Mori *et al.* 1979). In our model, maternal reproductive parameters such as pregnancy rate, litter size and weight at birth were not affected by diet (supplementary data). The role of the suckling period alone in terms of its implications for the postnatal growth and development of offspring has been less frequently investigated. Indeed, all mammals experience a post-gestational period during which maternal nutritional support of the offspring is wholly milk-dependent (Langer 2008). Colostrum and milk are complex fluids that exert effects that go far beyond their nutritional value. They confer nutritive, protective and adaptive benefits on newborns (McClellan *et al.* 2008) since immune factors, lymphoid and non-lymphoid cells as well as antigens are not only transferred from mother to foetus via the placenta during pregnancy in species with a hemochorial placenta (such as humans, rodents and rabbits), but also from mother to pups via colostrum and milk during breastfeeding. In this context, the roles played by bioactive compounds in milk (including hormones, cytokines and microRNA) in supporting of neonatal development are of considerable importance. Lactation may have lasting effects on risk factors that influence the adulthood of offspring (Stettler & Stallings 2002; Stettler *et al.* 2005) and in particular the metabolic phenotype. Furthermore, since maternal diet influences milk composition, changes to maternal nutrition, even a long time before lactation, may therefore exert long-term effects in offspring in terms of their predisposition to chronic conditions such as obesity (Widdowson & McCance 1963; Sun *et al.* 2012) or cardiovascular disease (Khan *et al.* 2005).

Changes in milk composition associated with maternal obesogenic feeding resulted in an increase in long-chain fatty acids and a fall in the medium-chain fatty acids characteristic of rabbits, as previously observed in rats (Rolls *et al.*, 1986). A striking characteristic of the FA profile of C rabbits was a high level (74%) of SFA. The lower proportion observed in OD milk was mainly due to octanoic acid (C8:0), decanoic acid (C10:0) and dodecanoic acid (C12:0). This finding is most likely associated with the *de novo* synthesis of FAs within the lactating rabbit mammary gland (Strong & Dils 1972). An increase in long-chain FA and a decrease in medium-chain FA in OD milk were correlated with the increased energy, total fat and long-chain FA contents of the OD diet. Similarly, an increase in milk MUFA, which were provided by the maternal diet was observed here.

It has been shown that obesity markedly modifies the expression profile of numerous adipokines, which are integrated in a communication network that involves several organs,

including the mammary gland (Ronti *et al.* 2006). In particular, mammary epithelial cells produce leptin (Smith-Kirwin *et al.* 1998; Aoki *et al.* 1999; Bonnet *et al.* 2002a; Bartha *et al.* 2005; Koch *et al.* 2013), which acts as an autocrine and paracrine factor to influence the development and differentiation of the mammary gland (Hu *et al.* 2002). Among our four groups of adult female rabbits, fed with C or OD milk and weaned on the C or OD diet, only the OD/OD group displayed elevated epithelial leptin mRNA levels, equivalent to those observed in adipose tissue. However, the proportions of adipose and epithelial tissues did not differ between the two OD-fed groups (C/OD and OD/OD). OD milk appears therefore as a specific regulator of leptin secretion in the mammary epithelium.

The field of early-life programming has made significant progress in understanding the offspring phenotypes that result from modifications to the perinatal diet. However, the questions remain as to the mechanisms involved in these outcomes. Fatty acids have been shown to play a critical role in several developmental processes, when programming of the various tissues and organs is still ongoing. The fatty acid composition in different organs (Gorski *et al.* 2006), is affected by the maternal diet and is involved in postnatal brain development (Morale *et al.* 2005). In rats, maternal exposure to a diet high in n-6 PUFA during pregnancy altered mammary gland morphology and increased tumor incidence in the offspring (Hilakivi-Clarke *et al.* 1997).

One interesting feature of endocrine regulation during mammary gland development is that the mammary gland produces significant amounts of hormones, which may be transferred from blood or be locally synthesized and secreted. Various studies have underlined the impact of inappropriate exposure to hormones during the foetal and neonatal periods (Mori *et al.* 1979). In particular, the production of leptin in adult mammary epithelial cells, and its possible regulation by early-life nutrition, is of considerable interest because leptin receptors are present in a number of tissues from an early stage of development. One might therefore expect it to act as a key factor regulating development at both the cellular and molecular levels, thus supporting the hypothesis that this cytokine may act as an autocrine and/or paracrine factor. In higher mammals, the early postnatal period represents a critical temporal window during which development processes occur and/or continue in many organs (Vickers *et al.* 2005; Attig *et al.* 2013). Leptin receptors have also been described in the mammary epithelial cells of several species (Aoki *et al.* 1999; Laud *et al.* 1999; Malik *et al.* 2001; Sayed-Ahmed *et al.* 2004; Bartha *et al.* 2005) and could thus modulate the mammary growth and differentiation in the offspring.

The present study was also designed to determine the relative effects of early postnatal nutrition via milk and/or late diet-related post-weaning nutrition introduced before puberty. Considering that leptinemia is correlated to fat mass, high levels of serum leptin could be expected in offspring fed the OD, as had previously been demonstrated in several animal models (Couvreur *et al.* 2011; Sun *et al.* 2012). No rise in local mammary leptin levels after OD consumption was observed in our experiments, except when OD was used in combination with milk from OD fed dams. Leptin synthesis by the rabbit mammary gland at Days 3 and 16 of lactation (Koch *et al.* 2013), may be linked to its secretion into colostrum and milk, respectively, as has already been described in women (Smith-Kirwin *et al.* 1998; Eilers *et al.* 2011), rats (Casabiell *et al.* 1997), cows (Pinotti & Rosi 2006), pigs (Estienne *et al.* 2000) and mice (Aoki *et al.* 1999).

Studies in rats have demonstrated that oral leptin is absorbed by the immature gastric epithelium of the neonate and that this leptin exerts clear biological effects during the earlier stages of neonatal life (Aoki *et al.* 1999; Pico *et al.* 2007; Beltrand *et al.* 2012), particularly by improving the maturation of different organs (Uysal *et al.*, 2002; Yura *et al.*, 2005; Attig *et al.*, 2008; Bouret, 2010; (Uysal *et al.* 2002; Attig *et al.* 2008; Priego *et al.* 2010; Attig *et al.* 2013).

Under our experimental conditions, long-term effects in adulthood were dependent upon combination of post-natal maternal (milk) and post-weaning nutrition. *In utero* and postnatal environments have been shown to act independently and contribute additively to a long-term increased in the risk of breast cancer following a low-protein diet during pregnancy (Fernandez-Twinn *et al.* 2010). Thus, alterations to the pattern of leptin synthesis during neonatal life, which may be due to the consumption of inadequate milk, could similarly produce significant long-term adverse effects on mammary gland development.

It is particularly important to determine these critical nutritional periods when considering their long-term consequences on the health and development of offspring. Moreover, mechanistic and functional outcomes, as well as the possible long-term effects of milk fatty acids and/or leptin of milk constituents on their own, or within their complex synergistic interactions, still need to be elucidated. Nevertheless, taken together, our data highlight the potentially important role played by milk during critical early life windows in terms of regulating long-term growth and mammary function.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely thank Dr A. Tarrade for Mercator software training and Drs C. Duvaux-Ponter and J. Djiane for their helpful discussions and advice. We also wish to thank the UCEA (INRA, UE 1298, Unité Commune d'Expérimentation Animale) for taking care of the animals.

REFERENCES

- Andersen, C. L., J. L. Jensen, and T. F. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64: 5245-5250.
- Aoki, N., M. Kawamura, and T. Matsuda. 1999. Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 1427: 298-306.
- Attig, L. *et al.* 2013. Postnatal Leptin Promotes Organ Maturation and Development in IUGR Piglets. *PloS one* 8: e64616.
- Attig, L. *et al.* 2008. Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *International journal of obesity* (2005) 32: 1153-1160.
- Bartha, T., A. Sayed-Ahmed, and P. Rudas. 2005. Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. *Domestic animal endocrinology* 29: 193-202.
- Beltrand, J., D. M. Sloboda, K. L. Connor, M. Truong, and M. H. Vickers. 2012. The Effect of Neonatal Leptin Antagonism in Male Rat Offspring Is Dependent upon the Interaction between Prior Maternal Nutritional Status and Post-Weaning Diet. *Journal of nutrition and metabolism* 2012: 296935.
- Bonnet, M. *et al.* 2002. Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reproduction, nutrition, development* 42: 399-413.
- Casabiell, X. *et al.* 1997. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4270-4273.
- Couvreur, O. *et al.* 2011. Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PloS one* 6: e18043.
- Davis Rincker, L. E., M. S. Weber Nielsen, L. T. Chapin, J. S. Liesman, and M. J. VandeHaar. 2008. Effects of feeding prepubertal heifers a high-energy diet for three, six, or twelve weeks on feed intake, body growth, and fat deposition. *Journal of dairy science* 91: 1913-1925.

- Denamur, R. 1963. [Nucleic acids of the mammary gland during gestation and lactation in the rabbit]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 256: 4748-4750.
- Eilers, E. *et al.* 2011. Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. *Early Hum Dev* 87: 415-419.
- Estienne, M. J., A. F. Harper, C. R. Barb, and M. J. Azain. 2000. Concentrations of leptin in serum and milk collected from lactating sows differing in body condition. *Domestic animal endocrinology* 19: 275-280.
- Fernandez-Twinn, D. S. *et al.* 2010. Poor early growth and excessive adult calorie intake independently and additively affect mitogenic signaling and increase mammary tumor susceptibility. *Carcinogenesis* 31: 1873-1881.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Fortun-Lamothe, L. 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Animal reproduction science* 93: 1-15.
- Galio, L. *et al.* 2012. microRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205 and miR-200. *Physiological genomics*.
- Gorski, J. N., A. A. Dunn-Meynell, T. G. Hartman, and B. E. Levin. 2006. Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291: R768-778.
- Hennighausen, L., and G. W. Robinson. 2005. Information networks in the mammary gland. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6: 715-725.
- Hilakivi-Clarke, L. *et al.* 1997. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9372-9377.
- Hu, X., S. C. Juneja, N. J. Maihle, and M. P. Cleary. 2002. Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *Journal of the National Cancer Institute* 94: 1704-1711.
- Hue-Beauvais, C. *et al.* 2011. An obesogenic diet started before puberty leads to abnormal mammary gland development during pregnancy in the rabbit. *Dev Dyn* 240: 347-356.

- Khan, I. Y. *et al.* 2005. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288: R127-133.
- Koch, E. *et al.* 2013. Leptin gene in rabbit: cloning and expression in mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *Physiological genomics*.
- Koletzko, B., B. Brands, L. Poston, K. Godfrey, and H. Demmelmair. 2012. Early nutrition programming of long-term health. *The Proceedings of the Nutrition Society* 71: 371-378.
- Langer, P. 2008. The phases of maternal investment in eutherian mammals. *Zoology (Jena, Germany)* 111: 148-162.
- Laud, K., I. Gourdou, L. Bélair, D. H. Keisler, and J. Djiane. 1999. Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS Lett* 463: 194-198.
- Malik, N. M. *et al.* 2001. Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. *Endocrinology* 142: 5198-5202.
- McClellan, H. L., S. J. Miller, and P. E. Hartmann. 2008. Evolution of lactation: nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. *Nutrition research reviews* 21: 97-116.
- Morale, S. E. *et al.* 2005. Duration of long-chain polyunsaturated fatty acids availability in the diet and visual acuity. *Early Hum Dev* 81: 197-203.
- Mori, T., H. Nagasawa, and H. A. Bern. 1979. Long-term effects of perinatal exposure to hormones on normal and neoplastic mammary growth in rodents: a review. *Journal of environmental pathology and toxicology* 3: 191-205.
- Morrison, W. R., and L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *Journal of lipid research* 5: 600-608.
- Pico, C. *et al.* 2007. Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the post-natal period. *Genes & nutrition* 2: 139-141.
- Pinotti, L., and F. Rosi. 2006. Leptin in bovine colostrum and milk. *Horm Metab Res* 38: 89-93.
- Priego, T., J. Sanchez, A. Palou, and C. Pico. 2010. Leptin intake during the suckling period improves the metabolic response of adipose tissue to a high-fat diet. *International journal of obesity (2005)* 34: 809-819.

- Reed, M. G., C. V. Howard, and D. E. Y. GS. 2010. One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers. *J Microsc* 239: 54-65.
- Rolls, B. J., P. M. van Duijvenvoorde, and E. A. Rowe. 1984. Effects of diet and obesity on body weight regulation during pregnancy and lactation in the rat. *Physiology & behavior* 32: 161-168.
- Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical endocrinology* 64: 355-365.
- Rousseau, D., C. Helies-Toussaint, D. Moreau, D. Raederstorff, and A. Grynberg. 2003. Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285: H1294-1302.
- Sayed-Ahmed, A., M. Kulcsár, P. Rudas, and T. Bartha. 2004. Expression and localisation of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow. *Acta veterinaria Hungarica* 52: 97-111.
- Sejrsen, K. 1994. Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle. *The Proceedings of the Nutrition Society* 53: 103-111.
- Sejrsen, K., and S. Purup. 1997. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *J Anim Sci* 75: 828-835.
- Sejrsen, K., S. Purup, M. Vestergaard, and J. Foldager. 2000. High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. *Domestic animal endocrinology* 19: 93-104.
- Smith-Kirwin, S. M. *et al.* 1998. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1810-1813.
- Stettler, N., M. R. Elliott, M. J. Kallan, S. B. Auerbach, and S. K. Kumanyika. 2005. High prevalence of overweight among pediatric users of community health centers. *Pediatrics* 116: e381-388.
- Stettler, N., and V. A. Stallings. 2002. Adult obesity and growth in childhood. Association of birth weight with adult weight is confounded by maternal body mass index. *BMJ (Clinical research ed.)* 324: 674.
- Strong, C. R., and R. Dils. 1972. Fatty acid biosynthesis in rabbit mammary gland during pregnancy and early lactation. *The Biochemical journal* 128: 1303-1309.
- Sun, B. *et al.* 2012. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes* 61: 2833-2841.

- Uysal, F. K. *et al.* 2002. Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity. *Clinical nutrition* (Edinburgh, Scotland) 21: 157-160.
- Vickers, M. H. *et al.* 2005. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146: 4211-4216.
- Widdowson, E. M., and R. A. McCance. 1963. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character.* Royal Society (Great Britain) 158: 329-342.

	C diet	OD diet
Digestible energy (kcal/kg)	2378	2808
Fat (%)	2.03	7.65
Sugar (%)	3.55	13.09
Rough cellulose (%)	14.2	13.5
Starch (%)	19.43	11.45
Ca (g/kg)	8.02	7.91
P (g/kg)	6.67	6.09
K (g/kg)	9.99	9.99
Acid detergent fiber (%)	29.7	27.3
Lignin (%)	3.57	3.37
Crude protein (%)	18.8	16.48
Digestible protein (%)	13.9	12.75
Methionin (g/kg)	3.59	3.31
Methionin + cystein (g/kg)	8.79	3.08
<u>Lysin (g/kg)</u>	<u>8.55</u>	<u>7.94</u>

Table 1. Ingredients and chemical composition of control (C) and obesogenic (OD) diets

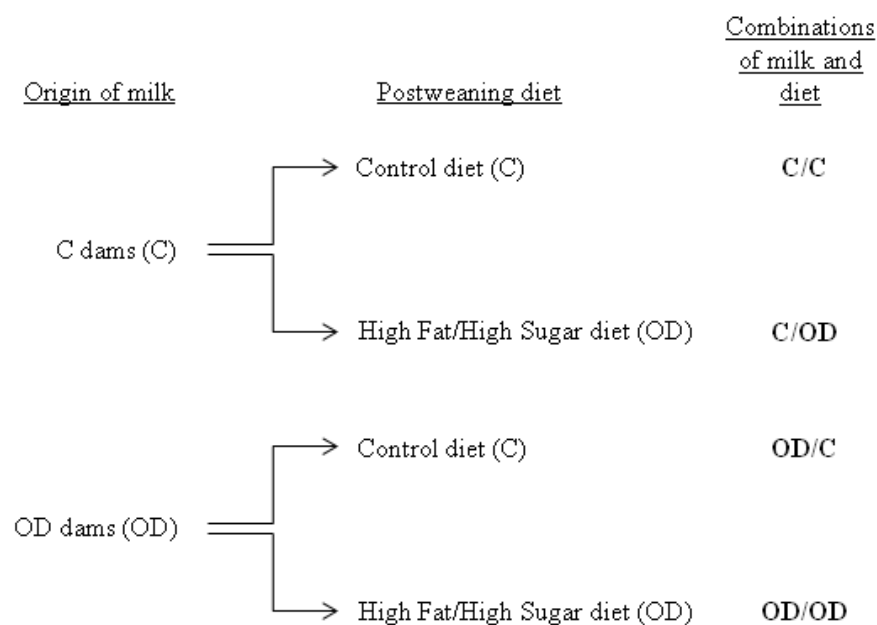


Fig. 1. Diagram depicting the design of animal experiments. C stands for control diet, OD for obesogenic diet. The four groups of rabbits fed milks from different origins (C or OD dams) and then fed different diets (C or OD) are indicated as C/C (n=10), C/OD (n=9), OD/C (n=9) and OD/OD (n=8), for Milk/Diet, respectively.

Fatty acids	C milk	OD milk	<i>P</i> value	Fatty acids	C milk	OD milk	<i>P</i> value
C8:0 ¹	28.5 ± 1.68	14.8 ± 0.88	0.0003	C8:0 ²	14.7 ± 0.75	12.4 ± 0.85	0.0401
C10:0 ¹	23.9 ± 1.10	14.5 ± 0.94	0.0003	C10:0 ²	12.5 ± 0.80	11.9 ± 0.76	0.8354
C12:0 ¹	8.12 ± 0.20	2.31 ± 0.19	0.0205	C12:0 ²	1.7 ± 0.16	1.8 ± 0.14	0.3916
C14:0 ¹	1.6 ± 0.06	1.7 ± 0.08	0.9315	C14:0 ²	0.9 ± 0.09	1.4 ± 0.10	0.0037
C16:0 ¹	14.2 ± 0.87	19.7 ± 0.68	0.0022	C16:0 ²	7.5 ± 0.87	16.7 ± 1.23	0.0012
C18:0 ¹	2.7 ± 0.21	6.0 ± 0.25	0.0003	C18:0 ²	1.4 ± 0.19	5.2 ± 0.46	0.0003
Total SFA ¹	74.0 ± 1.75	59.1 ± 1.28	0.0003	Total SFA ²	38.6 ± 2.35	49.5 ± 2.78	0.0541
mc SFA ¹	55.5 ± 2.60	31.6 ± 1.88	0.0003	mc SFA ²	28.8 ± 1.59	26.1 ± 1.63	0.1868
lc SFA	18.5 ± 1.07	27.5 ± 1.85	0.0003	lc SFA ²	9.8 ± 1.12	23.4 ± 1.74	0.0003
C16:1 n-7 ¹	2.1 ± 0.49	2.9 ± 0.22	0.0693	C16:1 n-7 ²	1.2 ± 0.36	2.4 ± 0.19	0.0289
C18:1 n-9 ¹	10.5 ± 0.90	24.0 ± 0.97	0.0003	C18:1 n-9 ²	5.6 ± 0.83	20.6 ± 1.71	0.0003
Total MUFA ¹	13.4 ± 1.40	28.6 ± 1.25	0.0003	Total MUFA ²	7.2 ± 1.24	24.5 ± 2.03	0.0003
C18:2 n-6 ¹	10.7 ± 0.48	10.5 ± 0.06	0.8354	C18:2 n-6 ²	5.6 ± 0.44	8.9 ± 0.61	0.0059
C18:3 n-3 ¹	1.5 ± 0.07	1.2 ± 0.06	0.0057	C18:3 n-3 ²	0.8 ± 0.05	1.0 ± 0.07	0.1203
Total PUFA ¹	12.6 ± 0.58	12.4 ± 0.48	0.9305	Total PUFA ²	6.6 ± 0.53	10.5 ± 0.68	0.0022
n-6 PUFA ¹	11.0 ± 0.50	10.9 ± 0.36	0.9999	n-6 PUFA ²	5.8 ± 0.48	9.3 ± 0.68	0.0059
n-3 PUFA ¹	1.6 ± 0.09	1.2 ± 0.06	0.0025	n-3 PUFA ²	0.8 ± 0.06	1.0 ± 0.06	0.1203
n-6/n-3 ratio ¹	5.2 ± 1.13	8.0 ± 1.36	0.0140	n-6/n-3 ratio ²			
Total FA ¹	100	100		Total FA ²	52.4 ± 3.84	84.5 ± 5.00	0.0012

¹% of total FA.

²g/l

SFA: saturated FA; mc: medium chain; lc: long chain; MUFA: monounsaturated FA; PUFA: polyunsaturated FA.

Table 2. Fatty acid (FA) composition and content in milk from C and OD dams.

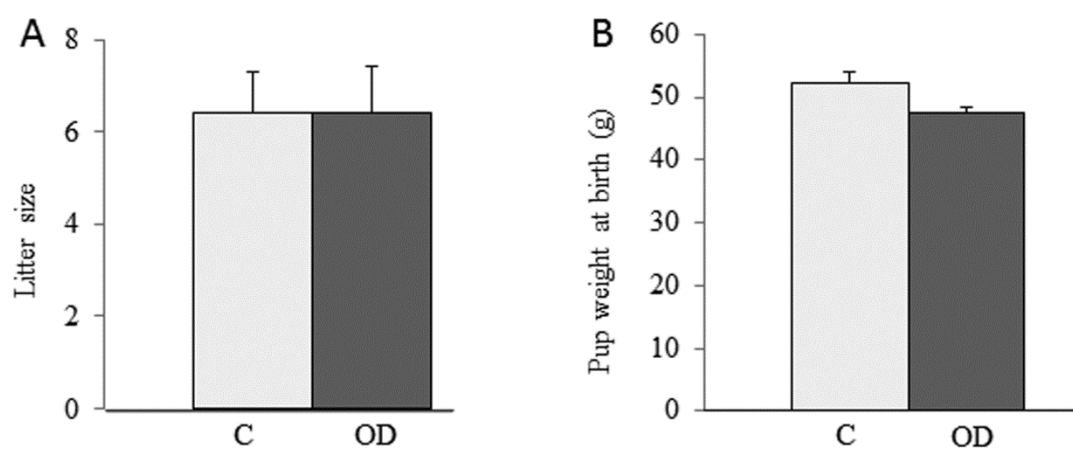


Fig. 2. Measurements of litter size (A) and pup weights (B) at birth in control (C) and obesogenic (OD) -diet fed dams

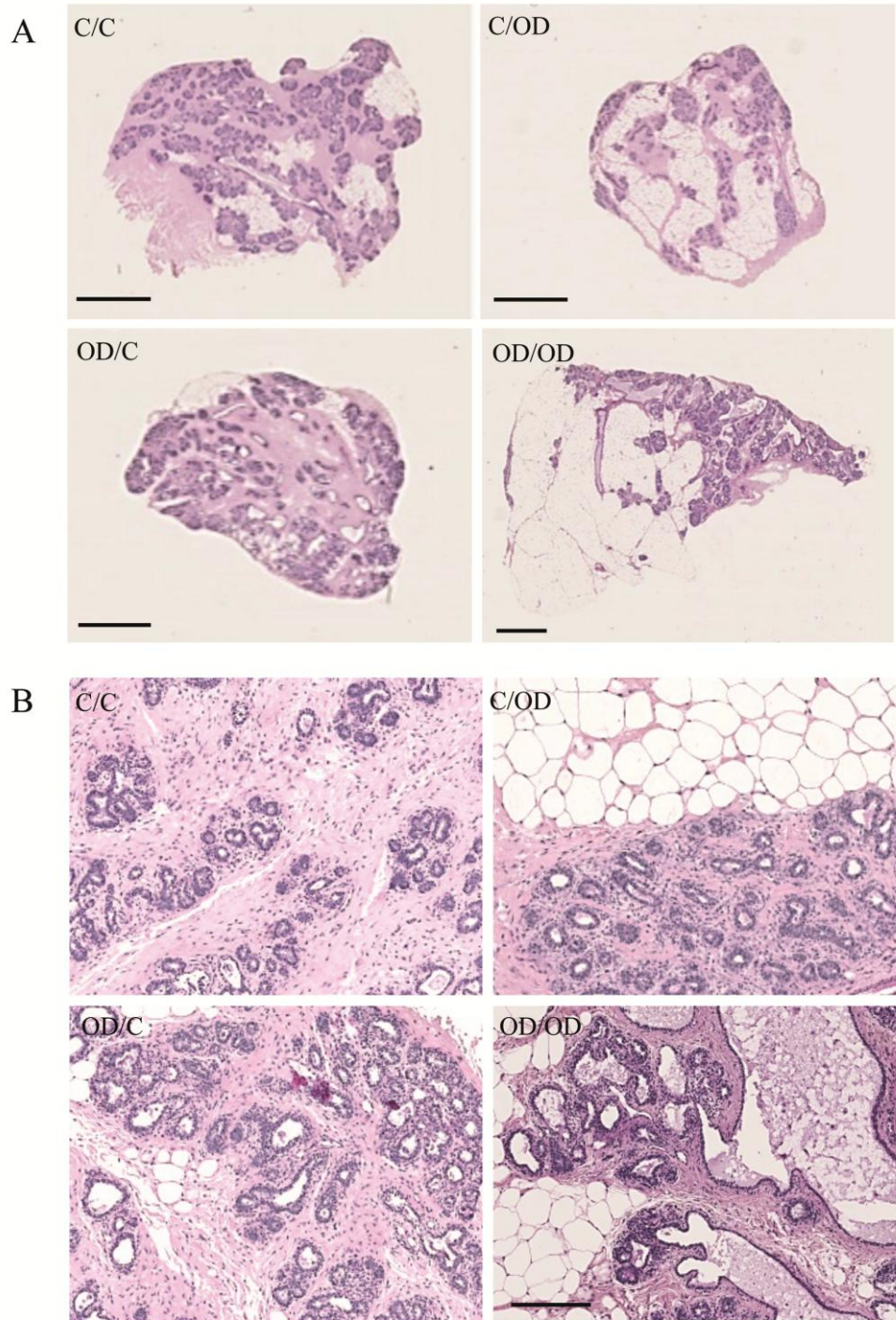


Fig. 3. Histological analyses of mammary gland at Day 8 of pregnancy. Hematoxylin and eosin staining on 5 μ m cryosections of mammary glands from the four groups of rabbits eosin staining on 5 μ m cryosections of mammary glands from the four groups of rabbits according to the milk and diet combination (C/C, C/OD, OD/C, OD/OD) were observed at different magnifications. A) Representative nanozoomer scans of low magnified sections. The scale bar represents 2 mm. B) Representative images using a higher magnification. Scale bars represent 250 μ m. C: control, OD: obesogenic.

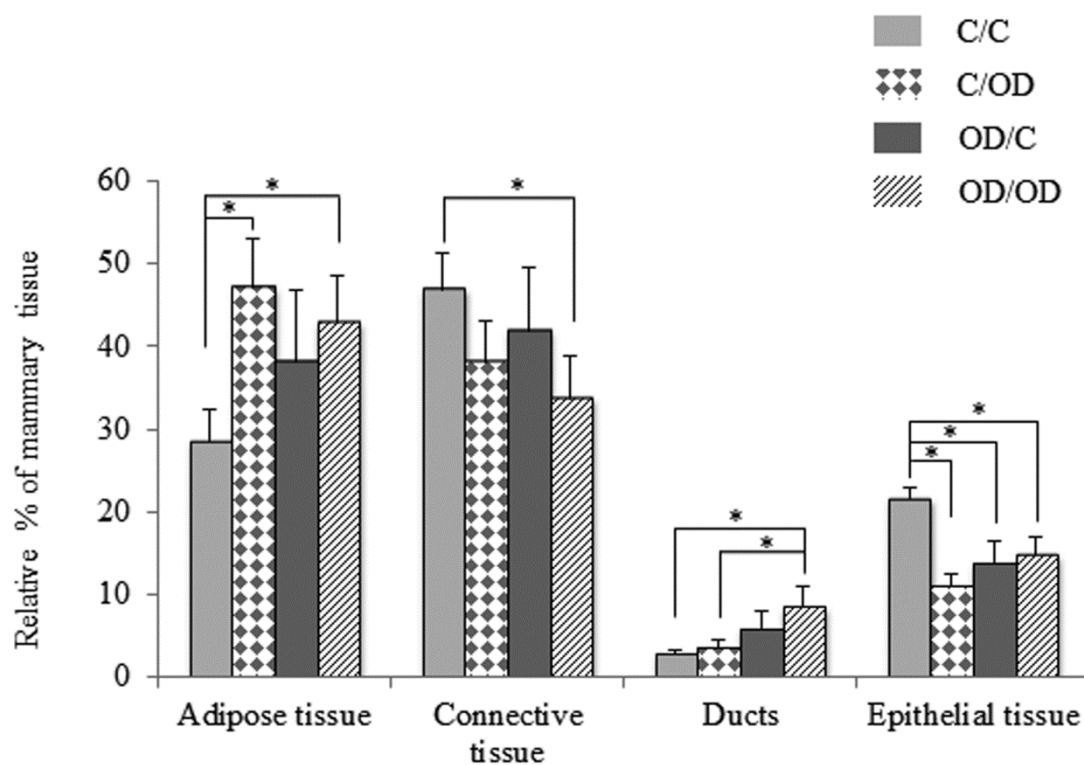


Fig. 4. Quantification by stereology of histological mammary gland sections. Analyses were performed in the four groups of rabbits according to the milk and diet combination (C/C, C/OD, OD/C, OD/OD) at Day 8 of pregnancy using Mercator software (ExploraNova, La Rochelle, France), and significant differences (at least $P < 0.05$) between groups are indicated by asterisks (*). Number of animals per group: C/C n=10, C/OD n=9, OD/C n=9 and OD/OD n=8. C: control, OD: obesogenic

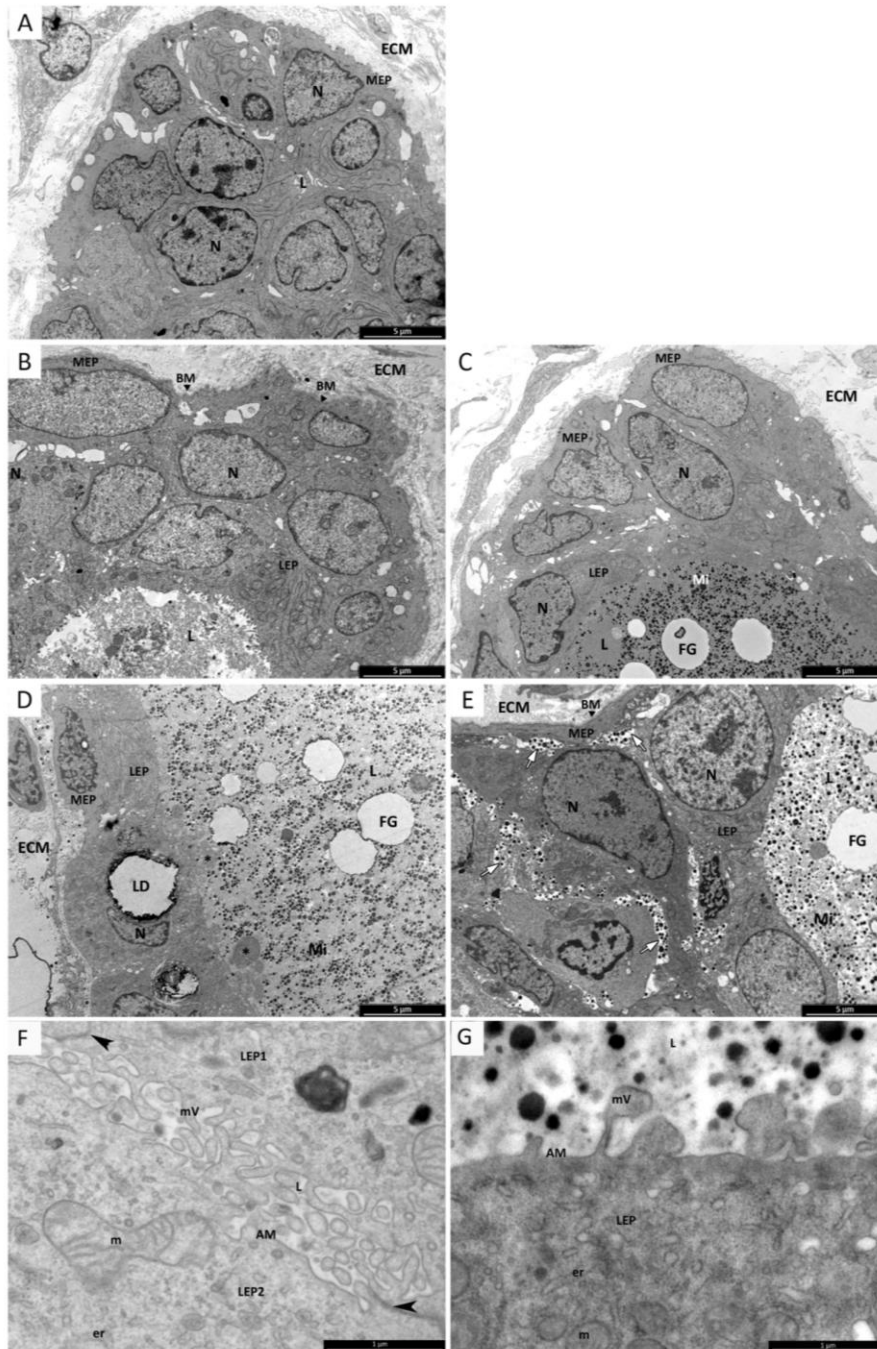


Fig. 5. Influence of the milk/diet combination on the rabbit mammary gland ultrastructure at Day 8 of pregnancy. Scale bars represent 5 μ m. MEP: myoepithelial cell, LEP: luminal epithelial cell, N: nucleus, LD: lipid droplet, FG: fat globule, L: lumen, ECM: extracellular matrix, BM with arrowhead: basement membrane, Mi: casein micelles, asterisk: membrane fingering/folding; the arrow represents the intercellular space with casein; black arrows: tight junctions; mV: microvilli, AM: apical membrane, m: mitochondria, er: endoplasmic reticulum. Ultrastructure of a representative C/C (A, F), OD/C (B), C/OD (C), OD/OD (D, E, G) mammary gland. C: control, OD: obesogenic

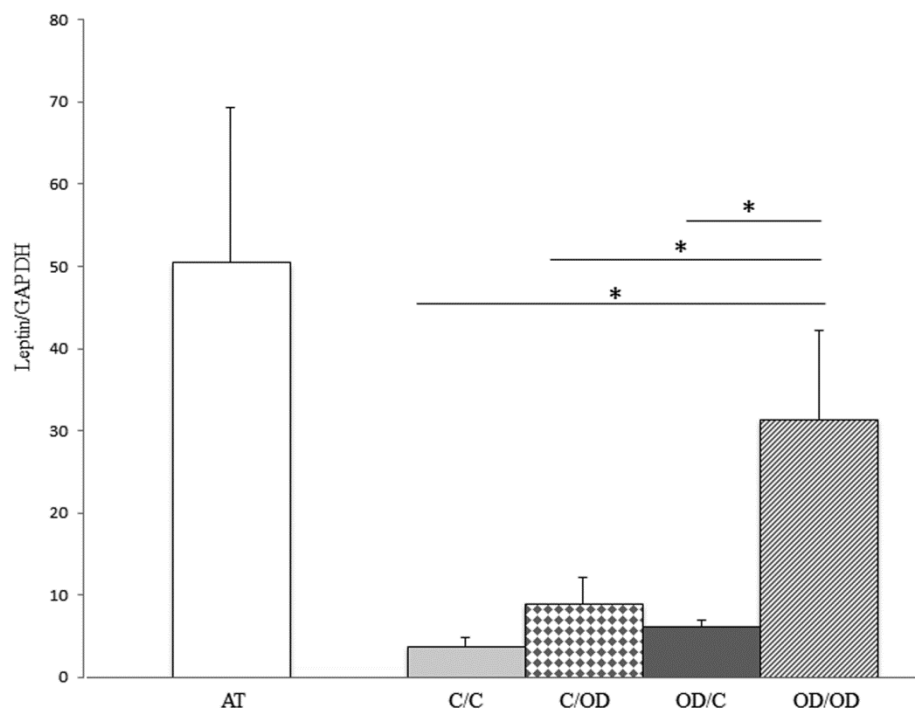


Fig. 6. Quantification of leptin mRNA in mammary epithelial tissue in the four groups of rabbits according to the milk and diet combination (C/C, C/OD, OD/C, OD/OD).. Samples from C/C (n=10), C/OD (n=9), OD/C (n=9) and OD/OD (n=8) groups were analysed using reverse transcription and a real-time polymerase chain reaction assay. Leptin and GAPDH levels were measured in mammary epithelial tissue collected from rabbits at day 8 of pregnancy. Mammary adipose tissue (AT) collected from three animals in each group was used as a positive control. Leptin/GAPDH mRNA ratios were calculated. Significant differences (at least $P < 0.05$) between groups are indicated by asterisks (*).C: control, OD: obesogenic

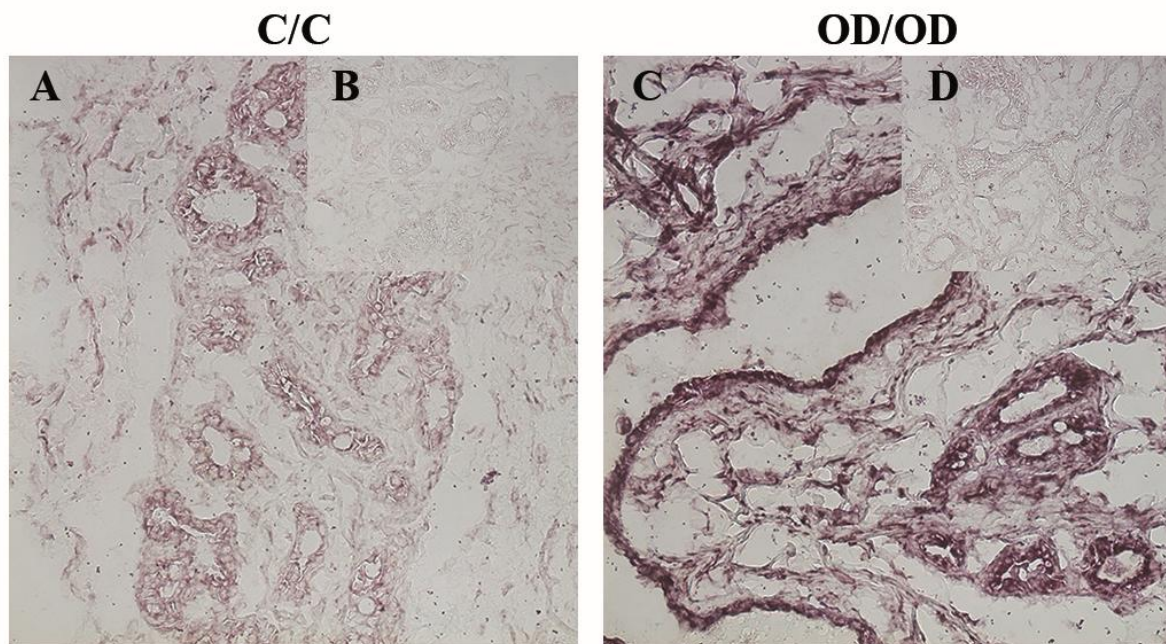


Fig. 7. Localization of leptin mRNA by *in situ* hybridization on rabbit mammary gland sections. Leptin mRNA was detected using a digoxigenin-labelled oligo LNA probe in representative C/C (A) and OD/OD (C) rabbits according to the milk and diet combination. Negative controls were performed simultaneously on sections from the same animals, using an antisense LNA probe (B for C/C group and D for OD/OD group, respectively). Scale bars stand for 200 μ m. C: control, OD: obesogenic

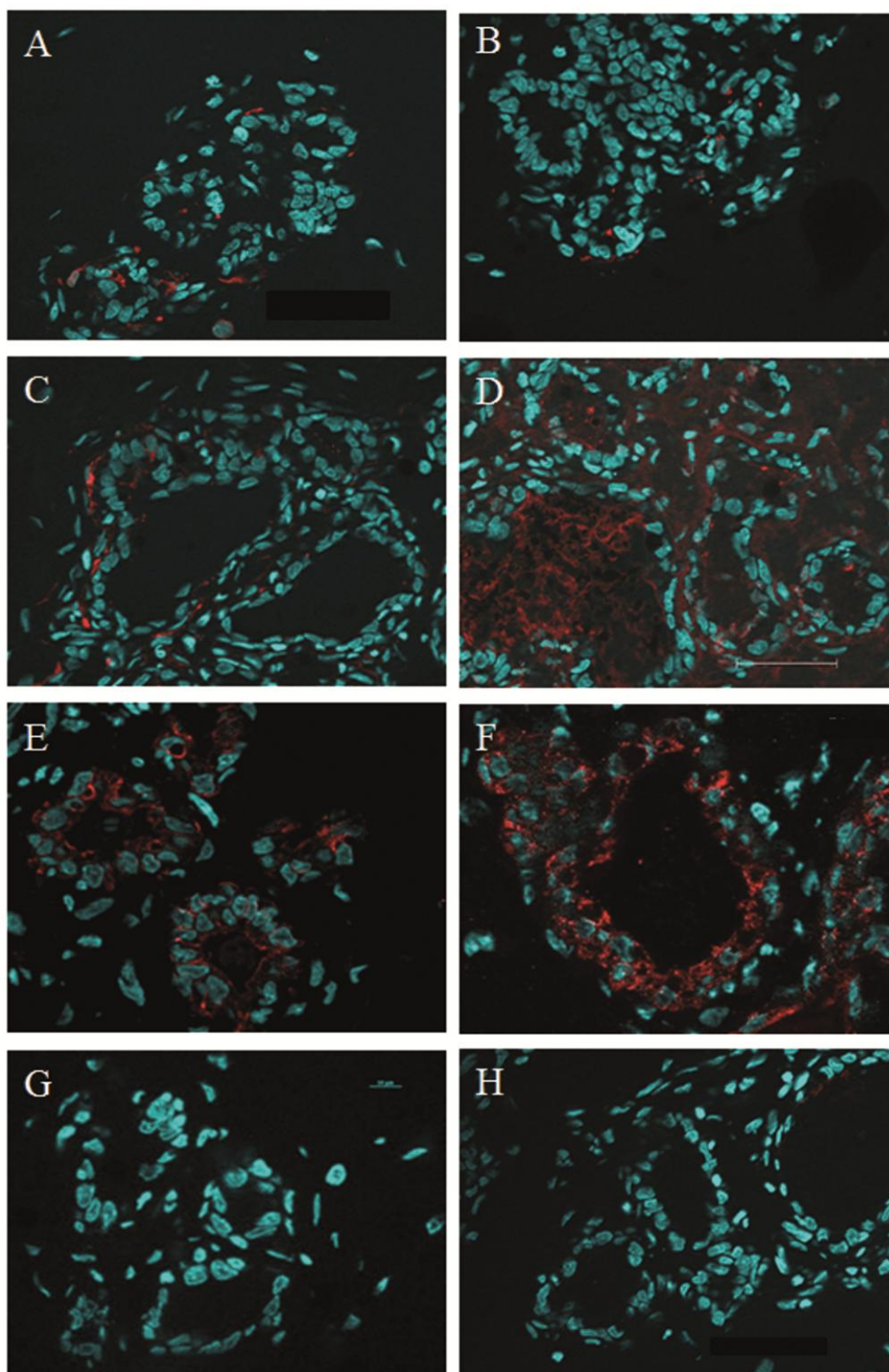


Fig. 8. Immunolocalization of leptin (A-D) and CK8 (E-F). A TRITC-conjugated antibody was used in rabbit mammary gland from day 8 of pregnancy in representative C/C (A and E), OD/C (B), C/OD (C) and OD/OD rabbits (D and F) according to the milk and diet combination. Negative controls are also shown (G and H). The nuclei were stained with DAPI. Scale bars represent 50 μ m. C: control, OD: obesogenic

Ce travail a montré que le lait de lapines ayant reçu le régime OB contient une quantité d'acides gras (AG) plus importante. Une répartition modifiée du profil de ces AG entre les laits T et OB a également été décrite. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence une altération du phénotype mammaire due au lait OB lorsqu'il est associé à un régime OB. En effet, les glandes mammaires des lapines ayant ingéré un lait issu de mères soumises au régime OB et ayant consommé le régime OB, depuis la puberté jusqu'à 8 jours de gestation, présentent un développement mammaire anormal : les canaux sont distendus et remplis de produits de sécrétion, les structures alvéolaires sont désorganisées et les cellules épithéliales sont caractérisées par des digitations au niveau de leur pôle apical et contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques. De plus, les analyses en microscopie électronique révèlent une « fuite » des produits de sécrétion vers les espaces intercellulaires. L'analyse par RT-PCRq de l'expression de la leptine au niveau de la glande mammaire a permis de mettre en évidence une forte expression de la leptine chez ces animaux, par rapport aux animaux des autres groupes étudiés. Cette synthèse locale de leptine a lieu au niveau des cellules épithéliales mammaires, comme démontré par des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de la nutrition pendant la période néonatale vis-à-vis des risques accrus d'obésité ou d'anomalies dans le développement mammaire ultérieur. De plus, ils apportent des arguments en faveur du rôle que la leptine pourrait jouer via le lait, au cours de phases nutritionnelles critiques, notamment dans le cas de la période néonatale. Cette action pourrait se traduire à long terme au niveau de la croissance et du développement mammaires.

2.3. Etude *in vitro* des variations des voies de signalisation Ob-R/MAPK/STAT3 induites par les produits de sécrétion des cultures primaires de glande mammaire de lapines nourries avec un régime obesogène, depuis la puberté jusqu'à 11 jours de gestation

Nous avons mis en évidence un développement précoce de la glande mammaire à mi-gestation, chez les lapines soumises à un régime obésogène à partir de la puberté (Hue-Beauvais *et al.* 2011). De plus nous avons montré que le niveau des ARNm codant la leptine augmentait à partir de la fin de la gestation et que ces transcrits étaient présents spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires luminales. Nous avons donc cherché à déterminer si la culture primaire de cellules mammaires à mi-gestation pouvait constituer un outil pertinent pour étudier les voies de signalisation de la leptine suivant deux axes :

- (1) ces cellules peuvent-elles répondre différemment à une stimulation par la leptine selon qu'elles sont issues d'un animal alimenté avec le régime T ou OB ?
- (2) ces cellules sécrètent-elles un facteur capable d'activer les voies de signalisation Ob-R/STAT3/MAPK ?

2.3.1. Etude des voies de signalisation de la leptine dans les organoïdes mammaires de lapines

Dans un premier temps, nous avons utilisé des cultures d'organoïdes mammaires, issus de glandes mammaires de lapines nourries depuis la puberté par un régime T ou OB, au 11^{ème} jour de gestation. La figure 24 montre clairement que les organoïdes mammaires forment des dômes irréguliers, adhérents au plastique de la boîte de culture, après 48h de culture dans du milieu GC3. On observe au niveau cellulaire, des cellules ayant la forme étoilée typique des cellules épithéliales. Aucune différence morphologique n'a été observée entre les cultures issues d'animaux T et celles d'animaux OB.

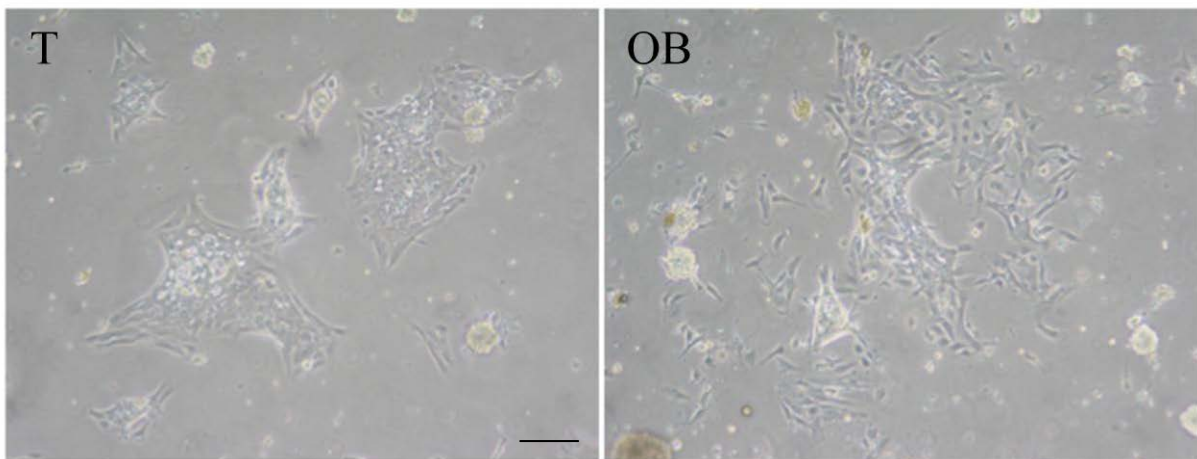


Figure 24 : Observation en microscopique optique des organoïdes mammaires en culture (échelle 100µm)

Afin de déterminer si les cellules en culture gardent leurs caractéristiques épithéliales mammaires après 5 jours de culture, nous les avons stimulées avec de la PRL et nous avons évalué l'activation du facteur STAT5 ainsi que la synthèse de la caséine en réponse à la PRL. Nous avons testé ce modèle au niveau fonctionnel en étudiant la capacité de ces organoïdes à répondre spécifiquement d'une part, à une stimulation courte et, d'autre part, à une stimulation longue. Les résultats, illustrés dans la figure 25, montrent qu'après 48 h de cultures les organoïdes, restent capables d'activer la voie de signalisation Jak2/STAT5 en réponse à la PRL et de synthétiser des protéines spécifiques de la glande mammaire, telles que la caséine κ , même si la variation de cette expression entre T et OB n'a pas été quantifiée dans le cas présent. Ils gardent donc leurs caractéristiques mammaires.

Nous avons ensuite étudié la capacité de ces organoïdes à répondre à une stimulation par la leptine. Dans ce cadre, nous avons comparé les réponses obtenues avec les organoïdes issus de lapines T ou OB, en termes d'activation de la voie STAT3. Le facteur de transcription STAT3 a été mis en évidence par western blot sous sa forme phosphorylée, active, après stimulation par la leptine recombinante de lapin (1µg/ml) et sans stimulation (GC3).

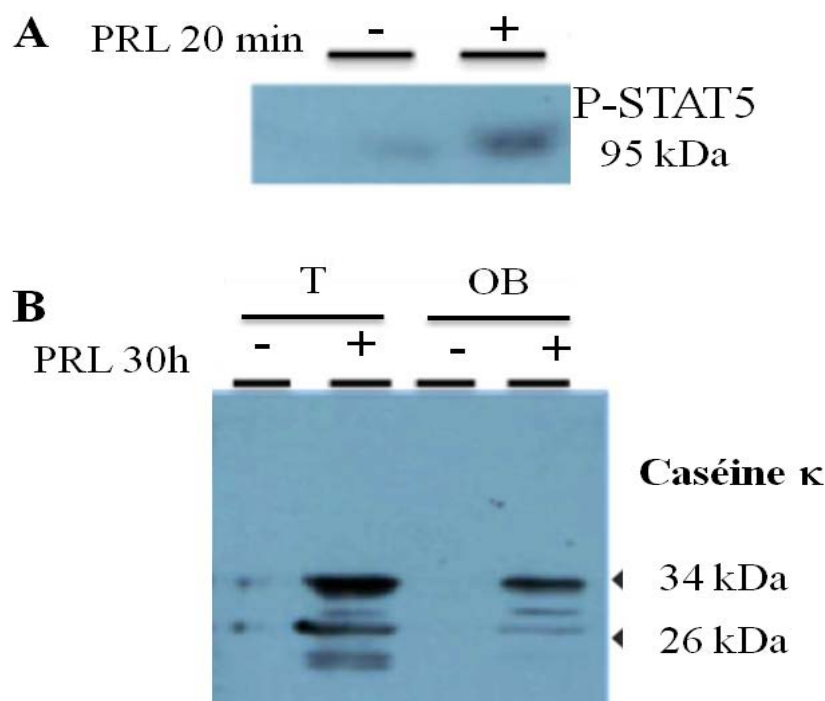


Figure 25 : Effet d’une stimulation par la PRL des organoïdes mammaires en culture
Effet d’une stimulation courte par la PRL sur la phosphorylation de STAT5 (A) et effet d’une stimulation longue par la PRL sur l’expression de la caséine κ dans des organoïdes mammaires de lapines alimentées avec le régime témoin ou obésogène et OB (B).

Les résultats ont été normalisés par rapport à la quantité de STAT3 totale présente dans les différentes préparations. Les témoins négatifs et positifs sont des extraits protéiques de cellules HEK293T transfectées avec l’isoforme longue du récepteur murin de la leptine, également stimulées ou non. Ces expériences ont été réalisées 3 fois à partir de 3 animaux différents pour chacun des régimes.

On observe, aussi bien dans le groupe T que dans le groupe OB, la présence de la forme phosphorylée de STAT3 en présence ou non de leptine (figure 26), démontrant ainsi l’activation de cette voie de signalisation dans les cultures d’organoïdes mammaires. L’analyse de plusieurs expériences, schématisée sur la figure 26B montre que l’activation de STAT3 n’est pas significativement différente entre les cellules non stimulées et les cellules stimulées par la leptine. Ces résultats conduisent à deux hypothèses : soit une stimulation

inefficace des cellules par la leptine recombinante, soit l'existence d'une sécrétion endogène de leptine par les cellules épithéliales mammaires qui activerait la voie de signalisation STAT3, rendant ainsi la stimulation par la leptine, introduite dans le milieu de culture, inefficace.

L'analyse densitométrique des blots issus de l'ensemble de ces expériences a mis en évidence une plus faible activation de la voie STAT3 dans les cultures OB, par rapport aux cultures issues de lapines T ($P < 0,05$). Cette activation différentielle n'a cependant été observée que sur deux des trois cultures réalisées et reste à confirmer. L'interprétation biologique de la variation de ce signal peut être liée à une différence de la quantité de leptine sécrétée par les cellules, ou bien à une différence au niveau des récepteurs de la leptine, entre les cellules T et OB.

Ce travail est le premier à montrer la présence de récepteurs fonctionnels de la leptine dans des modèles de cultures primaires d'organoïdes mammaires. Cependant, l'activation constitutive de la voie STAT3, ne permet pas de conclure quant à l'existence d'une différence dans la réponse à la leptine des cellules T et des cellules OB.

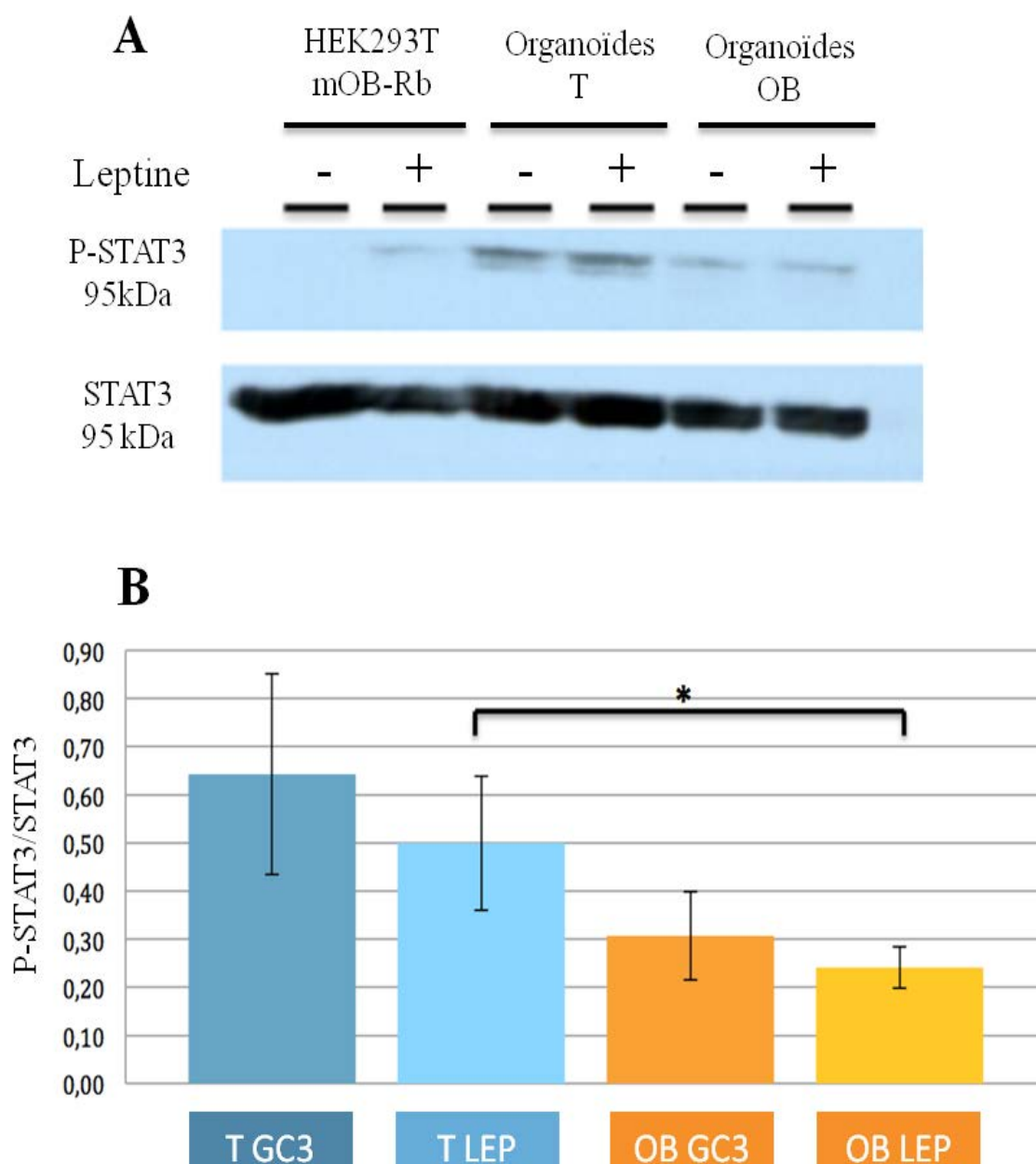


Figure 26 : Etude des voies de signalisation de l'Ob-Rb médiées par le facteur STAT3 dans les cultures d'organoïdes issus de glandes mammaires de lapines nourries avec le régime témoin ou obésogène

Mise en évidence des formes phosphorylées (P-STAT3) et totales de STAT3 par western blot dans les cultures issues de glandes mammaires de lapines nourries avec le régime témoin ou obésogène

(A) et quantification relative par ratio P-STAT3/STAT3 (B). Les expériences ont été réalisées sur 3 cultures différentes et les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem.

2.3.2. Etude des voies de signalisation de la leptine dans des cellules HEK293T transfectées avec l'Ob-Rb

Afin de mettre à l'épreuve les hypothèses évoquées dans le chapitre 2.3, nous avons développé un modèle cellulaire supplémentaire. Des cellules HEK293T n'exprimant pas l'Ob-R ont été transfectées avec l'isoforme longue de ce récepteur (Ob-Rb) murin, préalablement cloné au laboratoire. Ce système nous a permis dans un premier temps de déterminer quelles sont les conditions efficaces de stimulation des voies MAPK et STAT3 par des leptines recombinantes de différentes espèces. Nous avons fait des essais en utilisant différents temps de stimulation ainsi que des leptines recombinantes dont nous disposions : leptine ovine (ovLep) ou de lapine (LpLep). Nous avons fait également varier le temps de l'activité de l'hormone (préparation extemporanée ou datant de 6 mois conservée à -20°C notée « 6 mois »).

Ces expériences sont illustrées dans la figure 27 et ont permis de conclure que la phosphorylation de STAT3 suite à une stimulation par la leptine semble être le meilleur indicateur de l'induction d'un signal par cette hormone, en raison de la différence d'intensité du signal de la forme phosphorylée entre les états « stimulé » et « non stimulé ». Les différentes leptines recombinantes utilisées pour induire l'activation des voies de signalisation semblent toutes actives, quelle que soit l'espèce d'origine et ne perdent pas leur activité avec le temps, même après congélation. Ces résultats permettent d'exclure l'hypothèse d'une stimulation inefficace de la leptine observée entre les cultures d'organoïdes T et OB due à une dégradation/inactivation de la leptine utilisée.

La deuxième hypothèse est celle de la sécrétion endogène de leptine dans le milieu par les organoïdes en culture. Cette hypothèse a été examinée en collectant des milieux de culture d'organoïdes à différents temps de culture. Ces milieux conditionnés ont été comparés sur la base de leur capacité à activer la voie de signalisation STAT3 dans le modèle de cellules HEK293T transfectées avec l'Ob-Rb murin.

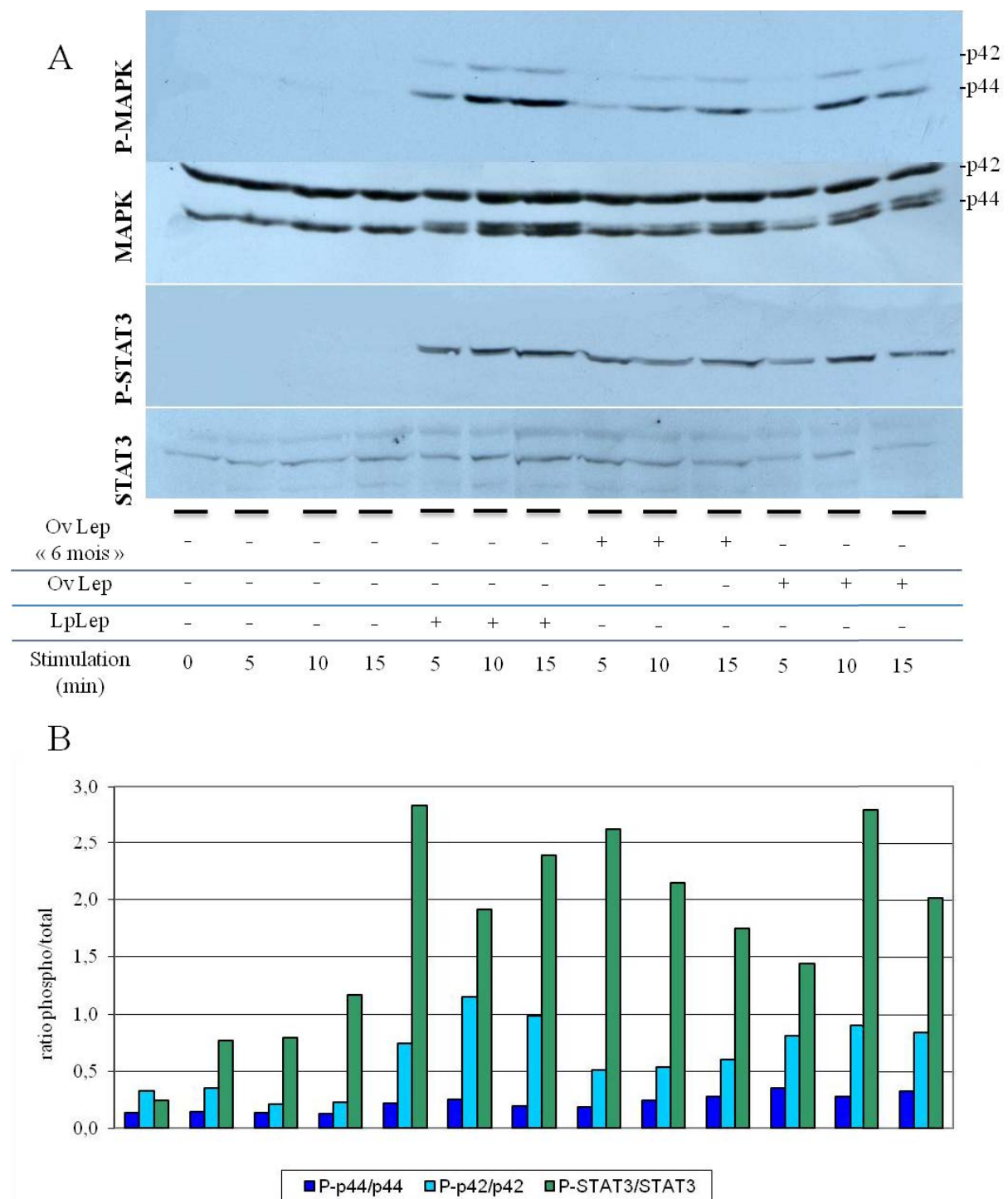


Figure 27 : Utilisation des cellules HEK293T transfectées avec l'isoforme longue du récepteur de la leptine pour l'étude des voies de signalisation induites par cette cytokine

Expression en Western blot des P-MAPK, MAPK, P-STAT3 et STAT3 dans les cellules HEK293T-mOb-Rb après différentes stimulations par la leptine (A) et quantification relative de cette expression (B).

A

Milieu OB 48 h	-	-	-		-	-	-	-	+
Milieu OB 24 h	-	-	-		-	-	-	+	-
Milieu T 48 h	-	-	-		-	-	+	-	-
Milieu T 24 h	-	-	-		-	+	-	-	-
Milieu non conditionné	-	-	-		+	-	-	-	-
LpLep 1 µg/ml	+	-	+		-	-	-	-	-
mOb-Rb	-	+	+		+	+	+	+	+

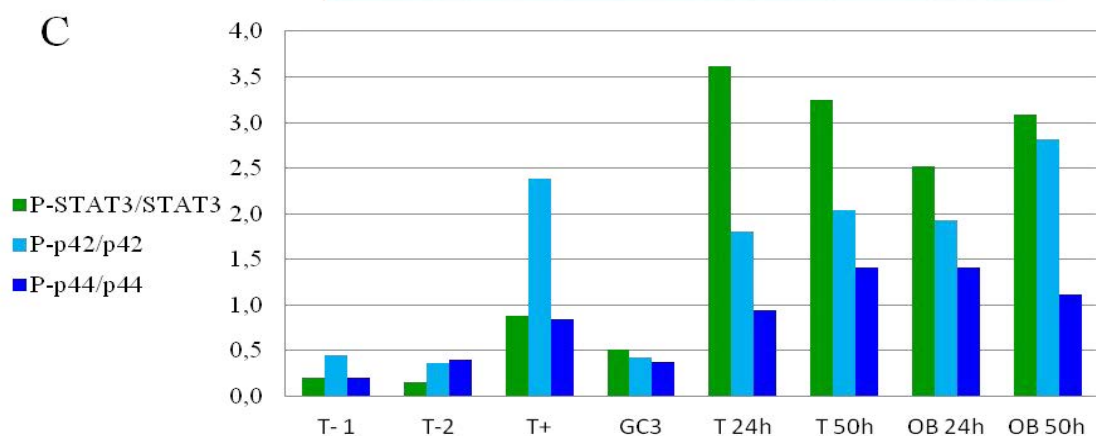
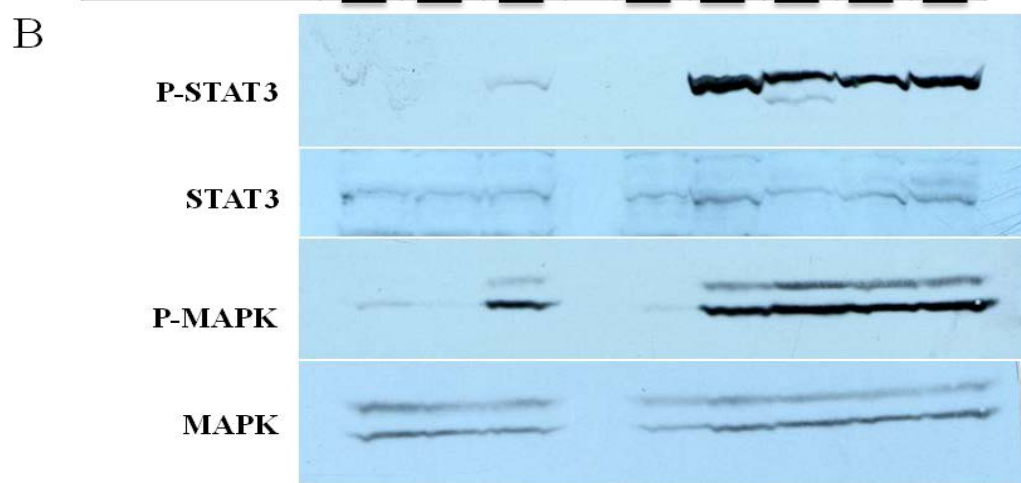


Figure 28 : Etude de l'activation des voies de signalisation de la leptine suite à l'addition de milieux conditionnés T et OB dans le milieu de culture de cellules HEK293T transfectées avec l'isoforme longue du récepteur de la leptine

Tableau récapitulatif des conditions expérimentales testées (1 P100 par condition) (A), activation des voies MAPK et STAT3 (B) et quantification relative de cette activation (C).

Les milieux conditionnés dans lesquels ont été cultivés les organoïdes mammaires issus de glandes mammaires de lapines nourries avec les régimes T et OB, contiennent un facteur capable d'induire l'activation des voies MAPK et STAT3 dans les cellules HEK293T transfectées avec le récepteur Ob-Rb (Figure 28). Ce facteur, absent du milieu de culture sans organoïdes, est sécrété dès 24 h de culture, aussi bien par les organoïdes T que les organoïdes OB. Il ne stimule les voies MAPK et STAT3 que lorsque les cellules sont transfectées avec l'Ob-Rb. De ce fait, il paraît vraisemblable qu'il s'agisse de la leptine sécrétée dont nous avons montré la synthèse par la CEM.

Des expériences de blocage de la leptine dans ces milieux conditionnés sont également envisagées afin de conclure quant à l'absence de l'implication potentielle d'un autre facteur que la leptine, sécrété par les organoïdes et susceptible d'induire l'activation des voies de signalisation MAPK et STAT3. Ce travail va être poursuivi dans un premier temps en tentant d'identifier plus précisément, par exemple par spectrométrie de masse, le facteur contenu dans ces milieux conditionnés et dans un deuxième temps en mettant en évidence une sécrétion différentielle de ce facteur, vraisemblablement la leptine, par les organoïdes mammaires issus de lapines T et OB. En effet, à l'heure actuelle, malgré des essais répétés, le dosage radio-immunologique de la leptine de lapin n'a pas abouti à des résultats exploitables.

2.3.3. Discussion

Nous avons mis en évidence un développement précoce de la glande mammaire à mi-gestation, chez les lapines soumises à un régime obésogène à partir de la puberté (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Les expériences de cultures d'organoïdes mammaires, issus de glandes mammaires de lapines, au 11^{ème} jour de gestation, nourries depuis la puberté par un régime T ou par un régime OB, montrent que ces organoïdes gardent leurs caractéristiques mammaires : après 48 h de culture, la PRL reste capable d'activer la voie de signalisation Jak2/STAT5 et d'induire la synthèse de protéines spécifiques de la glande mammaire. De plus, nous avons observé que dans ces organoïdes, une activation constitutive de la voie STAT3, empêche d'évaluer la capacité de ces cultures T ou OB à répondre à une stimulation par la leptine.

Des travaux ont mis en évidence la capacité de la leptine à contrôler indirectement la différenciation de la glande mammaire (Gonzalez *et al.* 1999). En effet, le développement de

la glande mammaire ainsi qu'une partie de ses fonctions dépendent de facteurs de croissance et d'hormones lactogènes, telles que la PRL dont la production peut être stimulée par une administration chronique de leptine. Il est donc raisonnable d'imaginer que la leptine puisse contrôler le développement mammaire en régulant, entre autres, le niveau de PRL. Le dialogue leptine-PRL a été étudié dans des cultures primaires d'explants de glandes mammaires bovines. Ces expériences ont permis de montrer que la leptine couplée à la PRL augmentait la prolifération des cellules mammaires en diminuant l'apoptose, positionnant ainsi cette cytokine comme un régulateur positif de l'action de la PRL *ex vivo* (Feuermann Y 2008). De plus, le rôle de la leptine, comme régulateur de la croissance et du développement de la glande mammaire a été démontré en liaison avec des facteurs immunitaires impliqués dans l'inflammation, tels que l'IL-6 et le TNF- α (Motta 2004).

Nos résultats montrent que les milieux de culture d'organoïdes contiennent un facteur capable d'induire l'activation des voies MAPK et STAT3, qui pourrait être la leptine, dans la mesure où la synthèse de cette cytokine par les cellules épithéliales mammaires de lapin a déjà été établie (Koch *et al.* 2013). Des études similaires en cancérologie ont montré que la leptine est synthétisée et sécrétée par des cellules mammaires tumorales et que cette sécrétion peut être modulée par des molécules ayant des propriétés anti-cancéreuses (Nejati-Koshki *et al.* 2012).

Des lignées de cellules mammaires tumorales humaines, MCF-7, expriment l'Ob-R et répondent à une stimulation leptinique par l'activation des voies de signalisation responsables de la prolifération cellulaire (Dieudonne *et al.* 2002). Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée humaine tumorale T47-D, dont les cellules expriment les formes longue et courte de l'Ob-R et prolifèrent en présence de leptine en activant spécifiquement la voie des MAPK (Laud *et al.* 2002). Ces résultats suggèrent une action paracrine *in vivo* de la leptine qui contribuerait à expliquer l'augmentation de l'incidence des cancers mammaires dans les cas d'obésité. Différentes études montrent la synthèse et/ou la sécrétion de leptine par des cellules mammaires non tumorales en culture, chez le bovin (Smith & Sheffield 2002; Yonekura *et al.* 2006) et chez la souris (Baratta *et al.* 2003), mais aucune chez le lapin. Ce travail de thèse soutient l'hypothèse de la présence de récepteurs fonctionnels de la leptine dans des modèles de cultures primaires d'organoïdes mammaires dans cette espèce.

3. ETUDE DES EFFETS D'UN REGIME OBESOGENE SUR LE DEVELOPPEMENT MAMMAIRE DANS DEUX SOUCHES DE SOURIS

Cet axe du projet consistait à évaluer la variabilité intra espèces, au niveau des effets sur la glande mammaire observés, dans un modèle d'alimentation altérée en fonction de plusieurs variables :

- Le fond génétique des animaux : souche FVB/N *vs* souche C57BL/6J
- La fenêtre nutritionnelle : de la puberté à la mi-gestation *vs* de la naissance à la mi-gestation
- L'alimentation : régime obésogène (OB) *vs* régime témoin (T) *vs* régime usuellement utilisé dans les élevages expérimentaux (M25)
- Le mode de reproduction : naturel *vs* superovulation

3.1. Effets d'un régime obésogène administré depuis la puberté, sur deux souches de souris

3.1.1. Effets sur la croissance et le métabolisme

3.1.1.1. Courbes de croissance et prise alimentaire

Bien que la prise alimentaire journalière, ne présente pas de différence ni entre les lignées, ni entre les régimes, les résultats de croissance des deux lignées, sous chacun des trois régimes présentent de nombreuses différences. La figure 29 montre que la lignée C57BL/6 et la lignée FVB/N suivent des courbes de croissance très différentes. Cependant le démarrage du régime, associé à l'isolement des animaux créé un stress dont la conséquence immédiate fut une perte de poids plus ou moins importante selon les fonds génétiques et les régimes.

Dans la souche FVB/N, pendant les 70 jours de régime, nous n'avons pas observé de différence significative des courbes de poids entre les groupes T et OB par rapport au groupe M25 servant de référence lorsque nous les avons comparés statistiquement suivant un modèle linéaire d'analyse de mesures répétées (figure 29A). Chez les souris C57BL/6, les courbes de croissances des régimes T et OB, se situent au-dessus de celles du régime de référence M25 ;

de même, la courbe OB est située au-dessus de la courbe T (figure 29B). Cependant ces différences ne sont pas significativement différentes au regard du modèle d'analyse statistique utilisé.

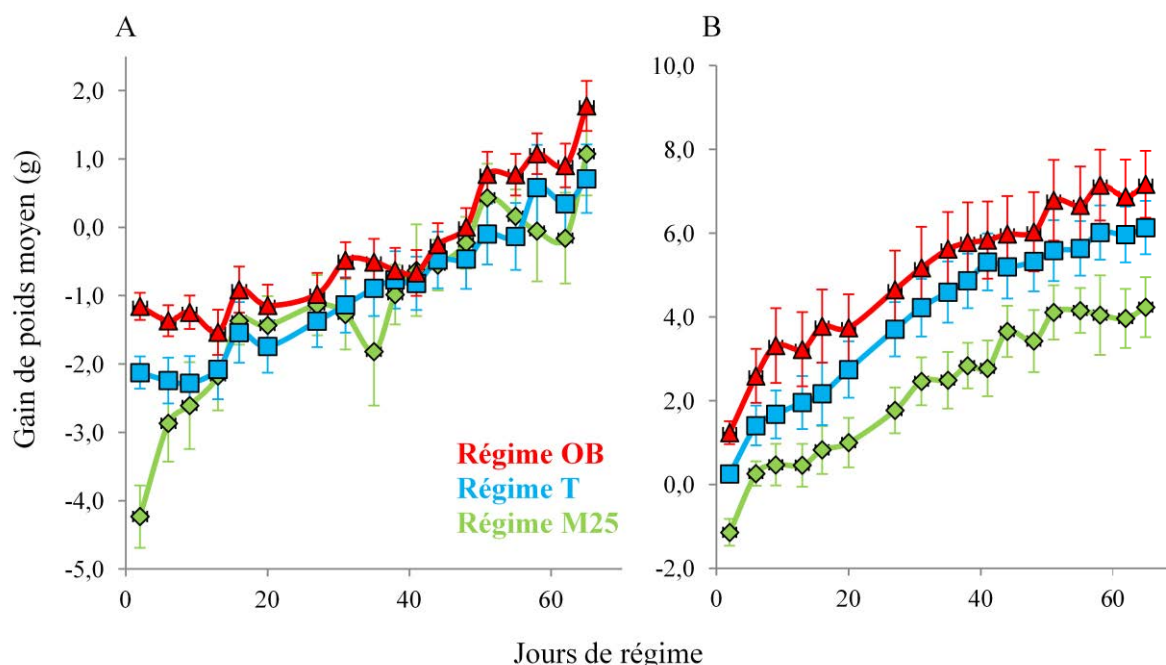


Figure 29 : Courbe de croissance de la cohorte 1. A : souche FVB/N B : Souche C57BL/6

La croissance est exprimée en gain de poids moyen, soit la variation entre le poids moyen durant le régime et celui avant le début du régime (point 0).

Ces résultats montrent que quel que soit le fond génétique et le régime administré au moment de la puberté, il n'y a pas de différence significative de poids entre les individus durant les 70 premiers jours de régime.

3.1.1.2. Etude des paramètres métaboliques

La figure 30 montre que le taux sérique de triglycérides (TG) est constitutivement plus élevé chez les animaux de la lignée FVB/N que chez les souris C57BL/6 (Lignée FVB/N : M25 $1,11 \pm 0,18$ g/l, T $1,14 \pm 0,29$ g/l, OB $1,44 \pm 0,26$ g/l ; lignée C57BL/6 : M25 $0,57 \pm 0,05$ g/l, T $0,46 \pm 0,02$ g/l, OB $0,50 \pm 0,12$ g/l), alors que les taux sériques de cholestérol (Lignée FVB/N : M25 $0,76 \pm 0,06$ g/l, T $0,97 \pm 0,07$ g/l, OB $0,94 \pm 0,07$ g/l ; lignée C57BL/6 : M25

0,65 ± 0,04 g/l, T 0,70 ± 0,08 g/l, OB 0,76 ± 0,06 g/l), ainsi que la glycémie à jeun (Lignée FVB/N : M25 0,85 ± 0,07 g/l, T 0,75 ± 0,07 g/l, OB 0,78 ± 0,05 g/l ; lignée C57BL/6 : M25 0,91 ± 0,04 g/l, T 0,76 ± 0,05 g/l, OB 0,83 ± 0,03 g/l), sont très semblables entre les deux lignées. De plus, dans les deux souches de souris, les teneurs en gras et en sucres des différents régimes n'affectent pas les concentrations des métabolites. Chez les souris de la souche FVB/N, une légère mais non significative augmentation de la triglycéridémie est observée avec le régime T et surtout OB, par rapport au régime de référence M25 (M25 1,11 ± 0,18 g/l, T 1,14 ± 0,29 g/l, OB 1,44 ± 0,26 g/l). La glycémie à jeun des individus ne semble pas non plus être modifiée par les régimes. Seule la cholestérolémie des animaux présente une augmentation significative dans les groupes T et OB, par rapport au groupe alimenté avec le régime M25, celui-ci étant moins gras que les deux autres (M25 0,76 ± 0,06 g/l vs T 0,97 ± 0,07 g/l, P=0,028 ; M25 0,76 ± 0,06 g/l vs OB 0,94 ± 0,07 g/l, P=0,05). La différence de teneur en graisses des régimes T et OB ne semble pourtant pas se répercuter au niveau sérique, puisque l'on n'observe pas de différence entre les valeurs mesurées pour les groupes T et celles des groupes OB (figure 30A).

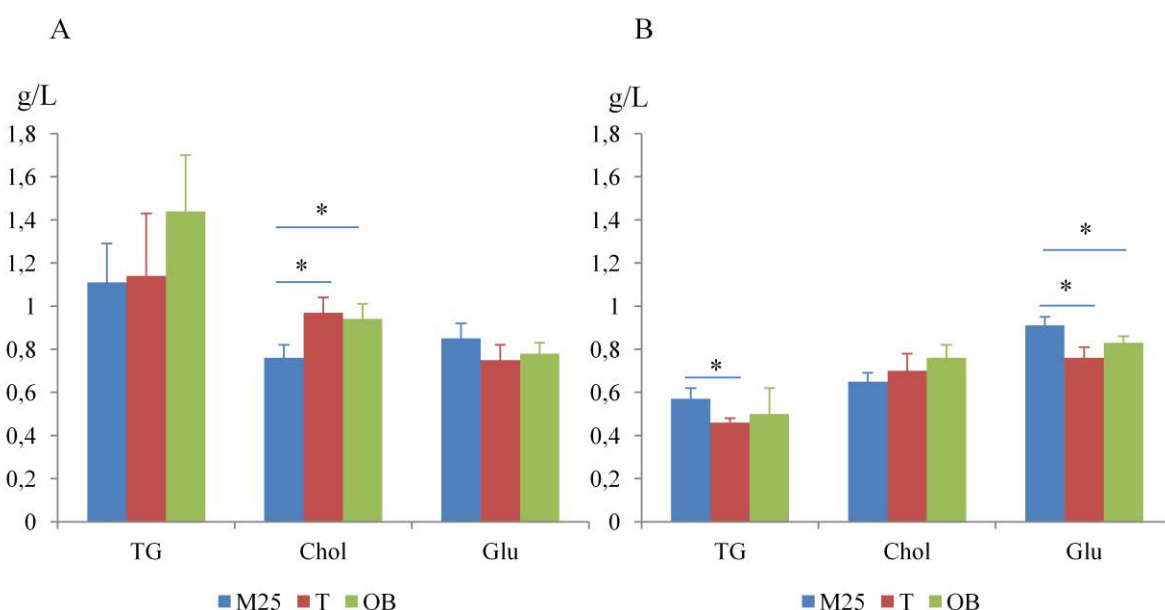


Figure 30 : Dosages sériques des triglycérides, cholestérol et glycémie à jeun dans les deux lignées de la cohorte 1 : FVB/N (A) et C57BL/6 (B)

L'astérisque désigne une différence significative entre les groupes ($P \leq 0.05$).

Chez les souris de fond génétique C57BL/6, les résultats des dosages des métabolites obtenus en comparant les différents régimes sont différents de ceux obtenus pour le fond génétique FVB/N (figure 30B). Dans cette lignée, contrairement aux individus de la lignée FVB/N, les régimes ne semblent pas modifier la cholestérolémie des animaux (M25 $0,57 \pm 0,05$ g/l, T $0,46 \pm 0,02$ g/l, OB $0,50 \pm 0,12$ g/l), alors que la glycémie à jeun diminue significativement chez les souris T et OB par rapport aux souris M25 (M25 $0,91 \pm 0,04$ g/l vs T $0,76 \pm 0,05$ g/l, $P=0,016$; M25 $0,91 \pm 0,04$ g/l vs OB $0,83 \pm 0,03$ g/l, $P=0,05$). Ce dernier résultat est cependant étonnant dans la mesure où le taux de sucres du régime T est plus important, et dans le cas du régime OB avec un pouvoir obésogène plus important, que celui du régime M25. Quant aux triglycérides, le taux sérique est significativement plus faible dans le groupe T que chez les individus nourris avec le régime M25, malgré une teneur en graisse, plus importante dans les aliments T et OB que dans l'aliment M25 (M25 $0,57 \pm 0,05$ g/L vs T $0,46 \pm 0,02$ g/L, $P=0,034$).

La moyenne des triglycérides plasmatiques chez les souris OB est donc légèrement supérieure à celle des souris T dans la lignée FVB/N, mais cette différence n'est pas significative, alors que la cholestérolémie ainsi que la glycémie à jeun restent inchangées. Cette observation peut être mise en relation avec l'absence de prise de poids significative des individus sous régime à partir de la puberté.

3.1.2. Effets sur la reproduction

Nous avons tout d'abord étudié le nombre de petits par portée à la naissance, dans le cas des souris accouplées de manière naturelle et dans celui des souris ayant subi une superovulation avant accouplement.

Le nombre de petits mort-nés étant comparable parmi les lignées et les régimes, nous n'avons donc pris en compte que les petits vivants sur les histogrammes de la figure 31.

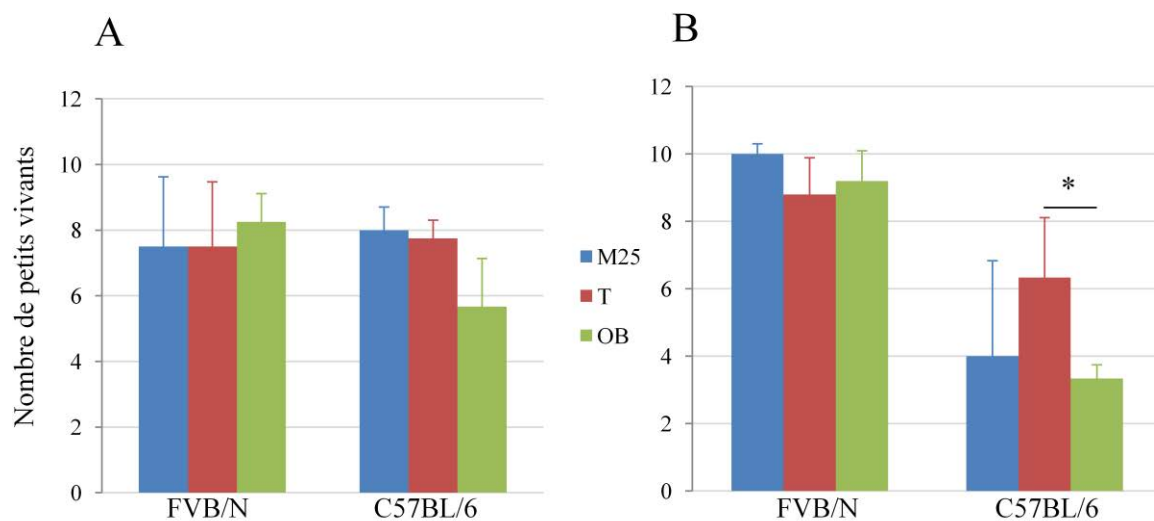


Figure 31 : Nombre de petits vivants par portée à la naissance en fonction des lignées et des régimes pour les accouplements naturels (A) et pour les superovulations (B)

Les différences significatives ($p < 0,05$) sont indiquées par un astérisque.

On observe que dans le cas des accouplements naturels, le nombre de petits par portée n'est pas significativement différent en fonction des lignées et des régimes. En revanche, chez les femelles FVB/N, la superovulation induit une augmentation, du nombre moyen de petits, bien que non significative, contrairement à la souche C57BL/6. En effet, de manière étonnante, la superovulation provoque dans cette dernière lignée une diminution significative du nombre de petits par portée, indépendamment du régime (accouplement naturel 7.1 ± 0.9 vs superovulation 4.55 ± 1.1 , $P < 0.05$). De plus, dans la lignée C57BL/6, le nombre de petits par portée est significativement plus faible chez les femelles soumises à un régime OB par rapport à celles soumises à un régime T.

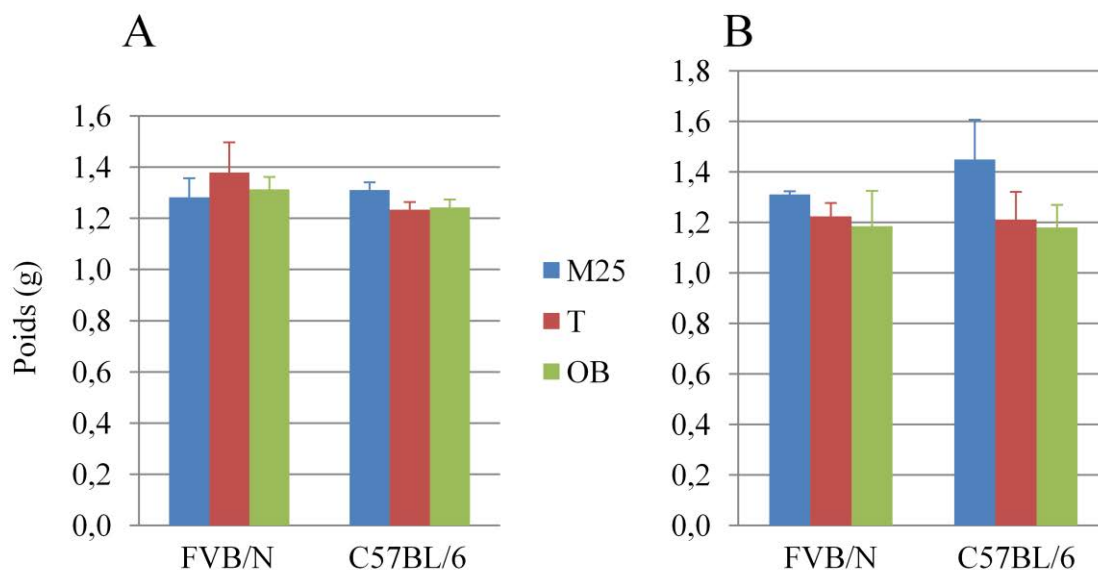


Figure 32 : Poids moyen des petits à la naissance

Le poids moyen des petits est évalué à naissance pour les animaux des deux lignées, pour chaque régime, pour les accouplements naturels (A) et pour les superovulations (B)

A la naissance, dans le cas des femelles accouplées naturellement, le poids moyen des petits ne diffère pas significativement entre la lignée FVB/N et la lignée C57BL/6, quel que soit le régime (figure 32A). Concernant les accouplements consécutifs à une superovulation des femelles, les résultats présentés sur la figure 32B, ne montrent pas de différence significative ni parmi les lignées, ni parmi les régimes, bien qu'on observe une moyenne plus élevée dans le cas des femelles de la lignée C57BL/6 alimentées avec le régime d'élevage M25. Cette augmentation n'est toutefois pas significative.

Les résultats illustrés par les figures 31 et 32 ont permis de mettre en évidence une absence d'effet des régimes sur la reproduction des animaux, à l'exception d'une diminution du nombre de petits par portée dans le cas d'accouplements précédés d'une superovulation dans la lignée C57BL/6. Ce résultat nécessiterait d'être confirmé.

3.1.3. Effets sur le phénotype mammaire à mi-gestation

3.1.3.1. Analyses morphologique du développement mammaire

La figure 33 montre les montages *in toto* de glandes mammaires à 12 jours de gestation, réalisés sur les fragments mammaires des souris de la cohorte 1. Les souris sous régime M25 nous servent de référence dans cette étude et l'évaluation de leur développement mammaire est considéré comme « normal » pour chacune des deux souches considérées. On observe que chez les souris de la lignée FVB/N, les canaux sont plus larges et le développement lobulo-alvéolaire plus important que chez les souris de la lignée C57BL/6 où les acini sont plus petits et les canaux plus fins. Cependant dans chacune des lignées étudiées, le régime ne semble pas apporter de modifications morphologiques visibles sur le développement mammaire à mi-gestation.

Des observations au microscope de la structure du tissu mammaire ont été réalisées dans chaque lignée et pour chacun des régimes (figure 34). Les coupes histologiques photographiées à deux grossissements, pour chaque régime, dans le cas de souris représentatives des lignées FVB/N (figure 34A) et C57BL/6 (figure 34B) montrent une densité en acini mammaires plus importante chez les femelles FVB/N que chez les femelles C57BL/6, quel que soit le régime. Ces analyses confirment l'absence de modifications morphologiques du développement mammaire à mi-gestation des souris de la cohorte 1, en fonction du régime alimentaire administré.

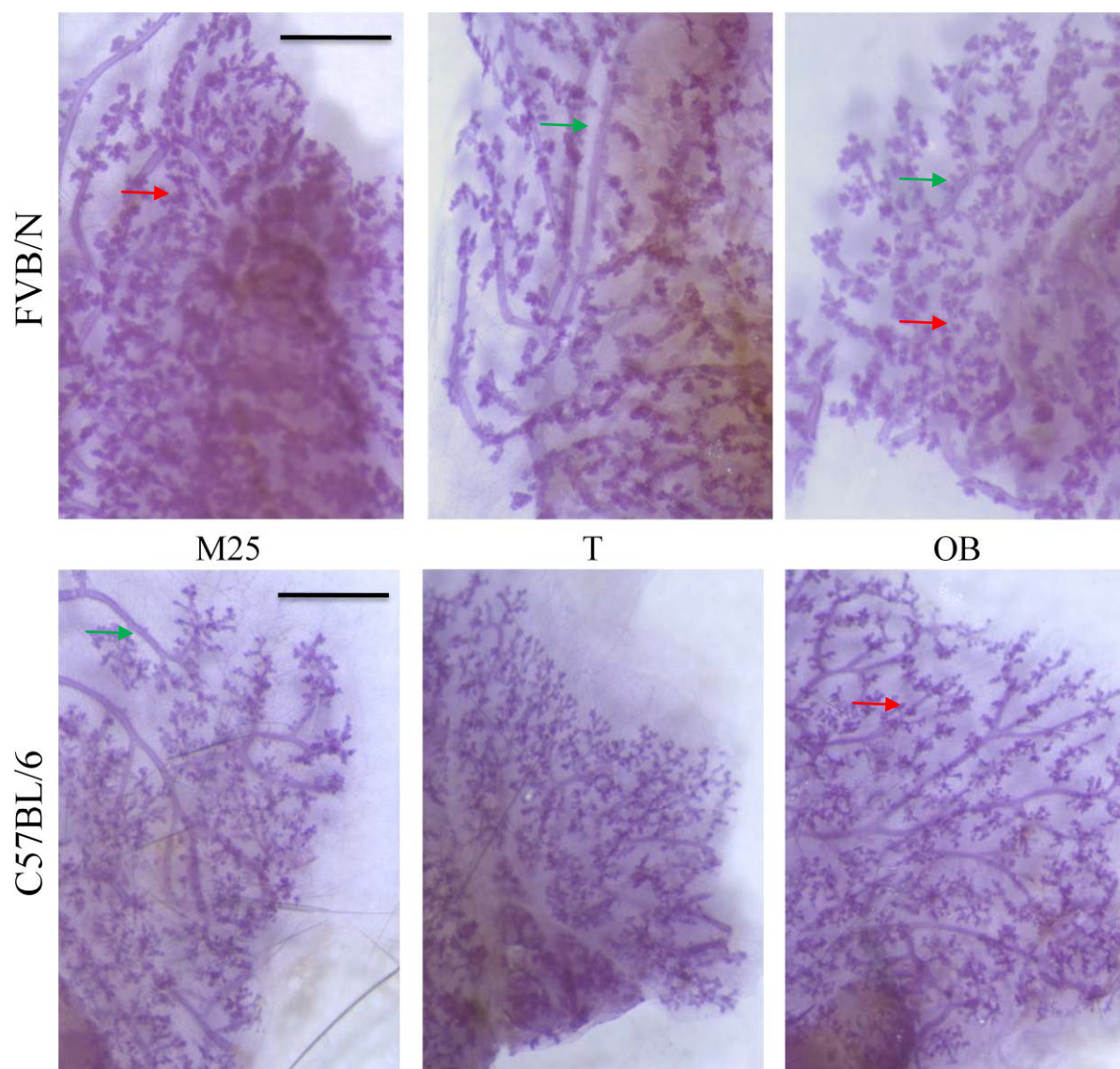


Figure 33 : Montages *in toto* représentatifs de glandes mammaires à 12 jours de gestation de souris de la cohorte 1

Barre d'échelle : 1mm

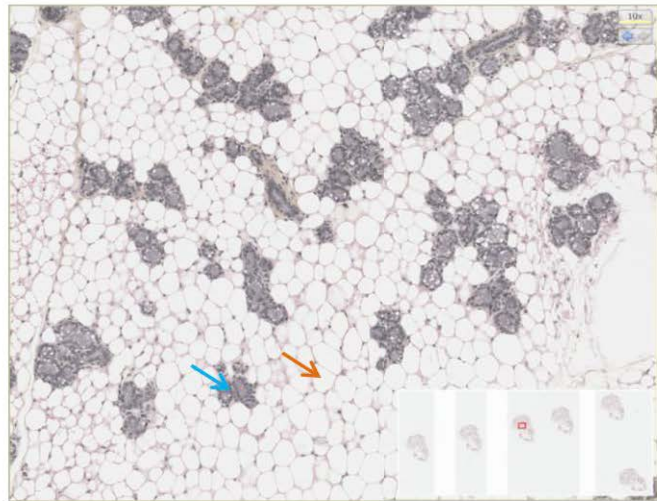
Les canaux mammaires sont montrés par des flèches vertes et les acini par des flèches rouges

A

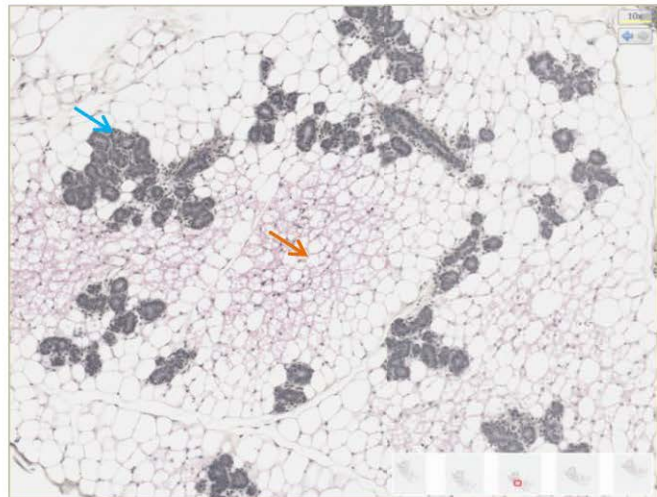
x12.5

x100

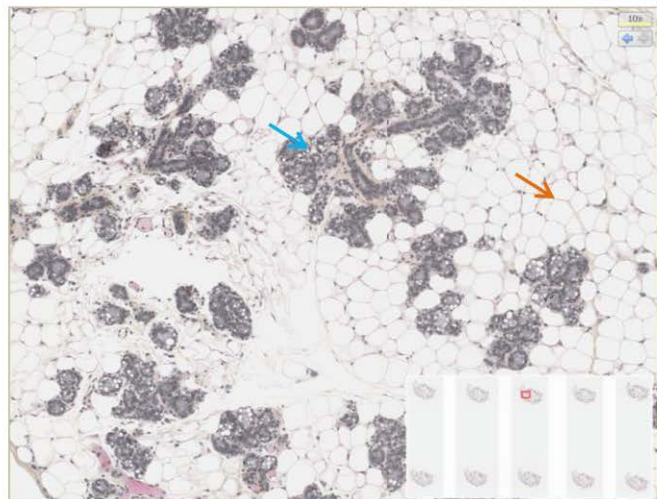
Régime M25



Régime T



Régime OB



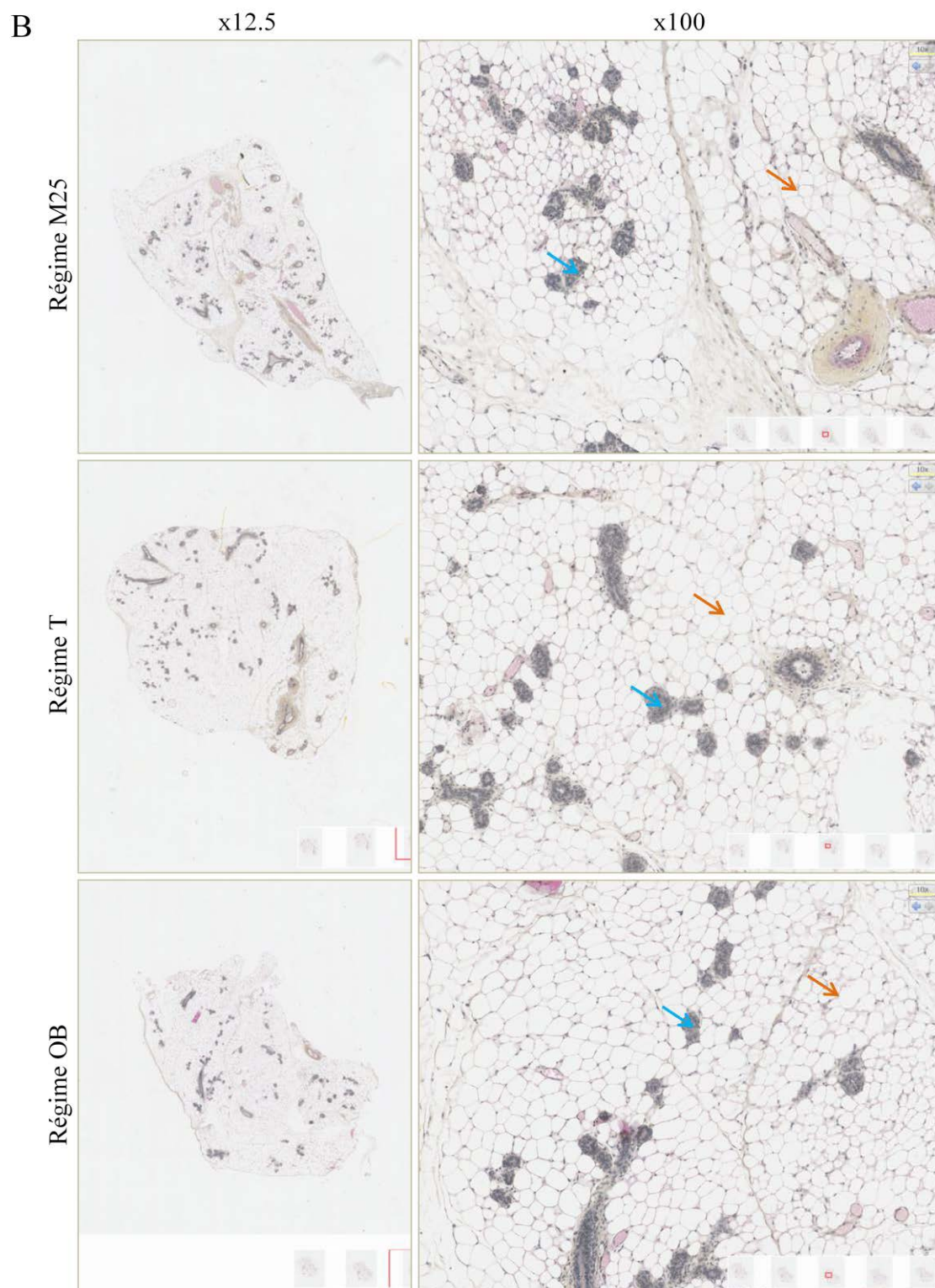


Figure 34 : Analyse histologique de glandes mammaires représentatives à mi-gestation des souris de la cohorte 1

Les observations sont réalisées à faible grossissement (x12.5) et à fort grossissement (x100) pour la lignée FVB/N (A) et C57BL/6 (B). Le tissu sécréteur est indiqué par les flèches bleues et le tissu adipeux par les flèches oranges.

3.1.3.2. Expression des protéines du lait dans des extraits mammaires à mi-gestation

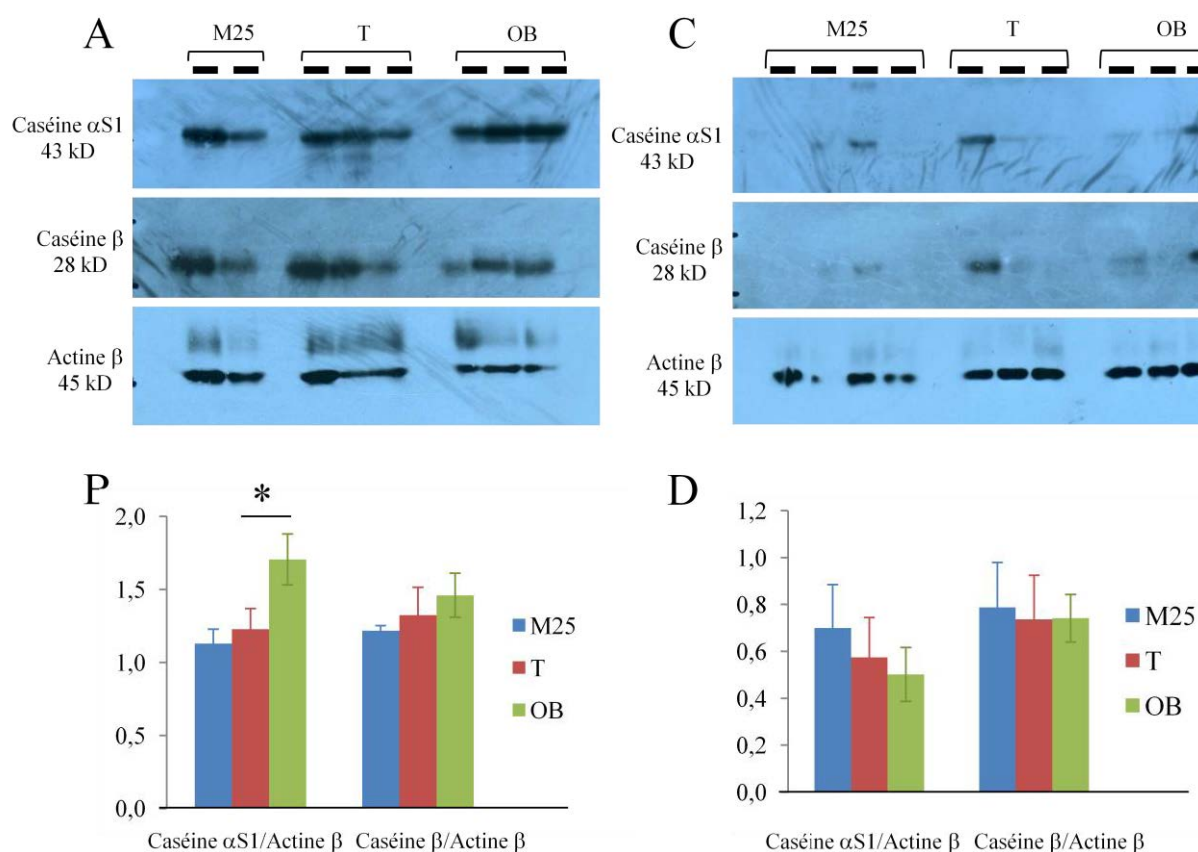


Figure 35 : Expression des protéines du lait dans les glandes mammaires de souris de la cohorte 1 à mi-gestation

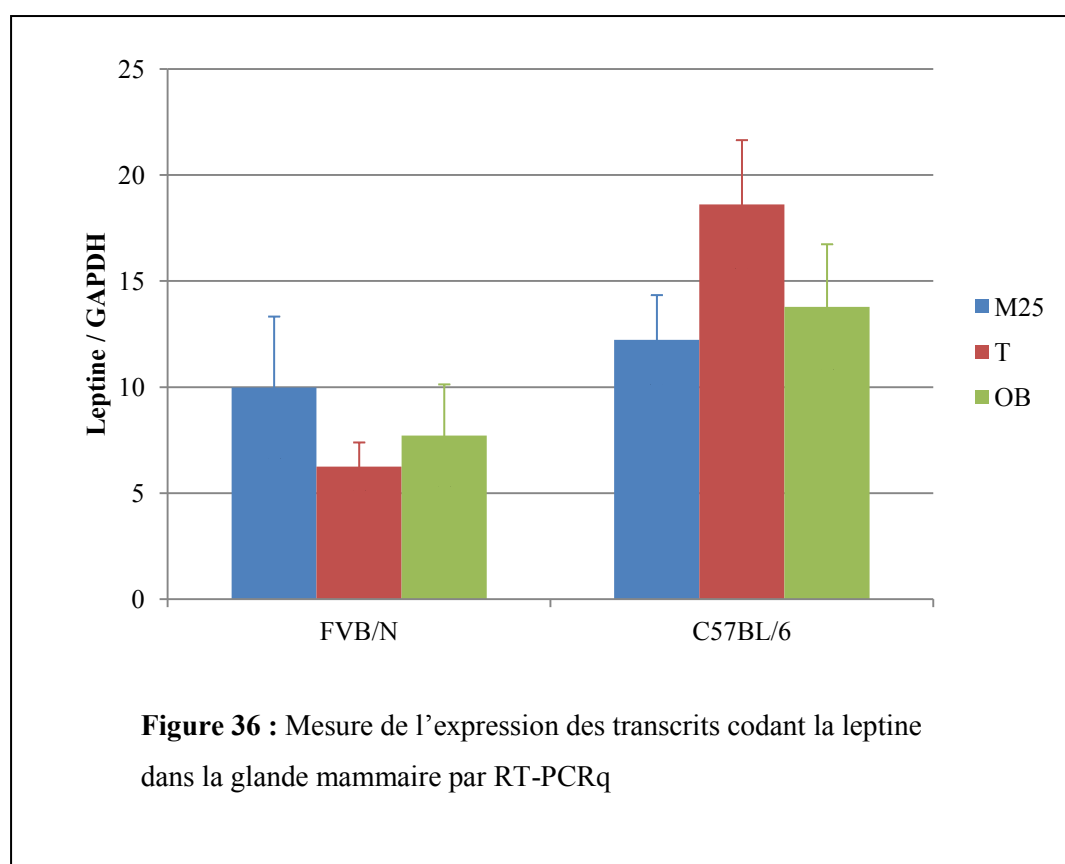
Expression des caséines αS1 et β analysées par western blot des souris FVB/N (A) et C57BL/6 (C) pour différents régimes. Quantification relative de cette expression pour chacune des lignées (B et D). Les différences significatives ($P < 0.05$) sont indiquées par un astérisque.

L'expression des caséines α S1 et β a été étudiée par western blot, à partir des biopsies de glandes mammaires réalisées à 12 jours de gestation, et une quantification relative des signaux a été effectuée par rapport à l'actine β (figure 35).

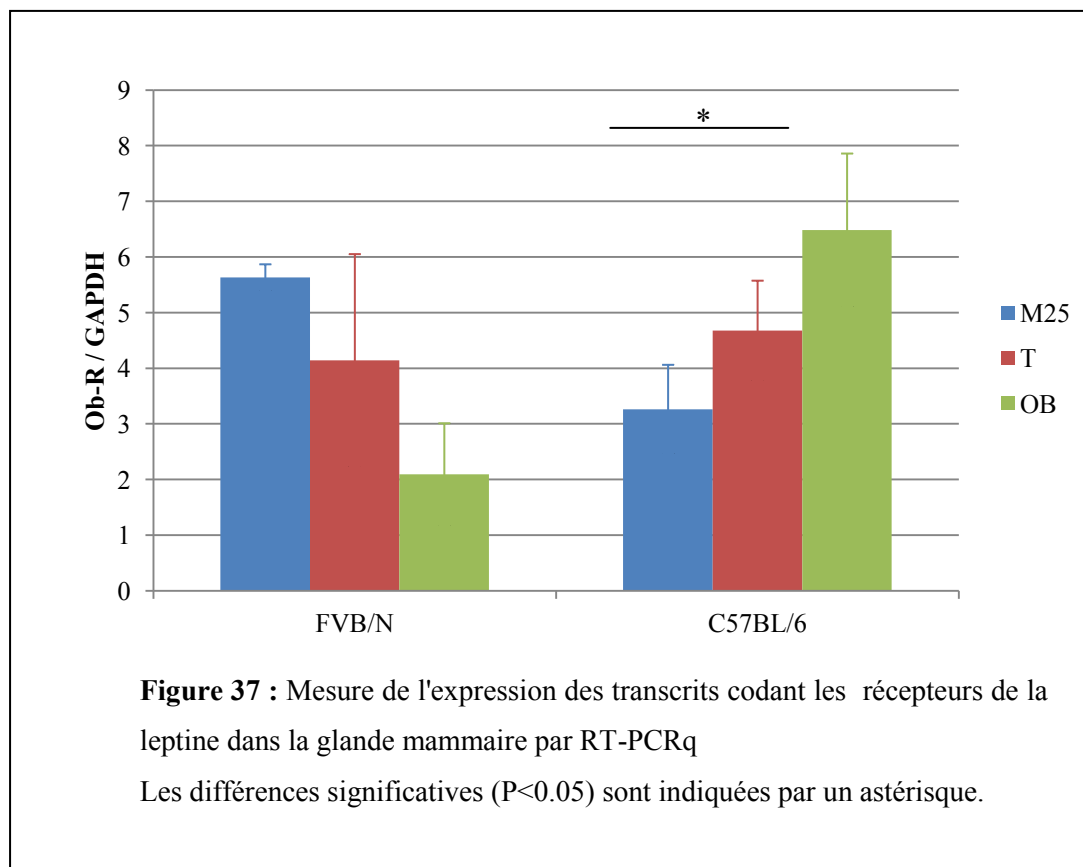
Le régime M25 correspond aux animaux dont l'expression des protéines mammaires à mi-gestation est considérée comme l'expression de référence pour chacune des souches. Dans la lignée FVB/N, une augmentation significative de l'expression de la caséine α S1 dans le tissu mammaire des souris alimentées avec le régime OB est observée. Cette augmentation n'est pas significative dans le cas de la caséine β (figure 35 A et B). Contrairement à la lignée FVB/N l'expression des caséines α S1 et β , à mi-gestation, dans la lignée C57BL/6, n'est pas plus élevée lorsque les souris sont soumises à un régime OB (figure 35 C et D).

3.1.3.2. Expression des transcrits codant la leptine et ses récepteurs

L'expression de la leptine ainsi que l'expression des Ob-R, toutes isoformes confondues, ont été estimées dans les glandes mammaires des animaux de la cohorte 1, à 12 jours de gestation.



La figure 36 montre des profils d'expression de la leptine variables selon les régimes et les lignées considérées. Cependant aucune différence significative de l'expression de la leptine dans la glande mammaire n'a pu être mise en évidence en raison d'une très forte variabilité individuelle.



L'expression des Ob-R a également été évaluée chez ces animaux (Figure 37). Une augmentation significative a été mise en évidence, uniquement dans la lignée C57BL/6, entre les glandes mammaires des souris alimentées avec le régime de référence M25, par rapport au régime OB. On constate toutefois que si cette expression tend à augmenter avec le régime OB, par rapport aux régimes M25 et T chez les souris C57BL/6, la situation inverse est observée chez les souris de la lignée FVB/N.

Ces résultats sont plus contrastés lorsqu'on représente pour chaque groupe et chaque lignée le rapport des transcrits codant pour la leptine, par rapport à ceux codant pour le Ob-R (figure 38). Ce ratio semble augmenter dans la lignée FVB/N sous l'effet du régime OB, suggérant d'après les résultats précédents une possible augmentation de l'expression des transcrits de la protéine, alliée ou non à une diminution de l'expression des transcrits du récepteur, comme

observé dans la figure 37. Inversement, dans la lignée C57BL/6 ce ratio semble diminuer avec l'alimentation OB, probablement en raison de l'augmentation de l'expression des transcrits du récepteur, illustrée sur la figure 37. Cependant, l'analyse de l'expression des récepteurs ne discriminant pas les différentes isoformes, il est possible que l'alimentation OB induise une modification préférentielle de l'une des formes du OB-R.

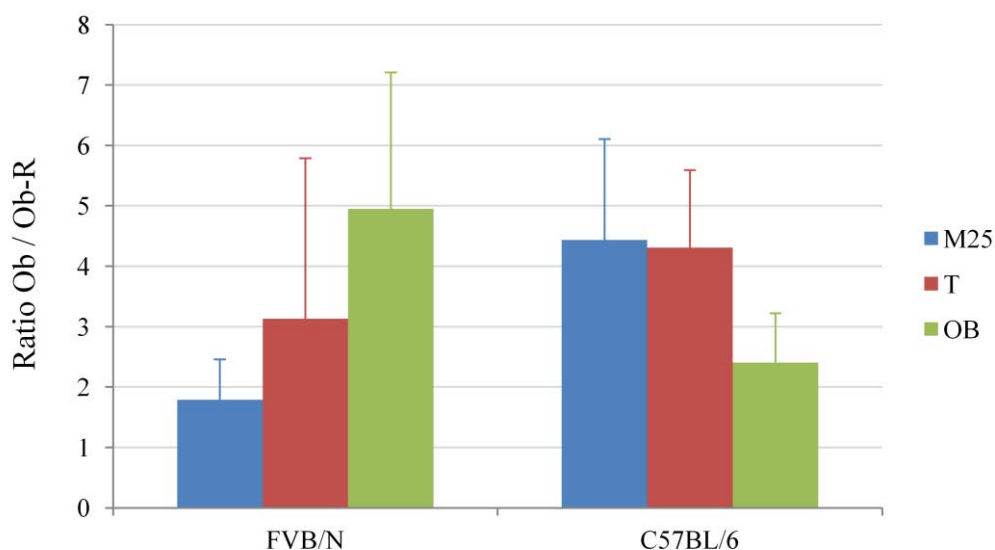


Figure 38 : Mesure du rapport d'expression des transcrits de la leptine et de son récepteur dans la glande mammaire

L'ensemble de ces résultats montre clairement d'une part, que l'administration d'un régime obésogène, à partir de la puberté, ne semble pas induire de modification forte de la composition du tissu mammaire à mi-gestation, quelle que soit la lignée de souris étudiée ; et, d'autre part, que le régime ne modifie pas l'expression des protéines du lait chez les souris de la lignée C57BL/6. De plus, seule une augmentation de l'expression de la caséine α S1 a été observée, et ce uniquement chez les souris de fond génétique FVB/N, dont le développement mammaire à mi-gestation est le plus prononcé, comme observé sur les analyses morphologiques. De façon étonnante, aucune variation de l'expression de la leptine n'a pu être mise en évidence chez les souris des deux lignées, en fonction du régime administré. Concernant l'expression des Ob-R dans les glandes mammaires à mi-gestation des souris de la cohorte 1, une étude approfondie nécessite d'être menée afin de caractériser plus précisément l'expression des différentes isoformes de l'Ob-R.

3.2. Etude des « effets combinés lait + régime », sur deux souches de souris

Dans le second volet de ce travail nous avons modifié la fenêtre nutritionnelle de notre étude, tout en conservant le régime de référence M25, ainsi que les régimes T et OB. Dans ce cadre, nous avons étudié les effets de l'alimentation néonatale sur la croissance jusqu'au sevrage, puis les effets « lait + régime » sur la croissance et sur le développement mammaire à partir du sevrage jusqu'à mi-gestation. Pour ce faire, des souriceaux nés de mère T ou OB ont été alimentés, depuis la naissance jusqu'au sevrage avec du lait de femelles nourrices ayant ingéré le régime T ou le régime OB depuis la puberté.

3.2.1. Effets de l'alimentation néonatale sur la croissance

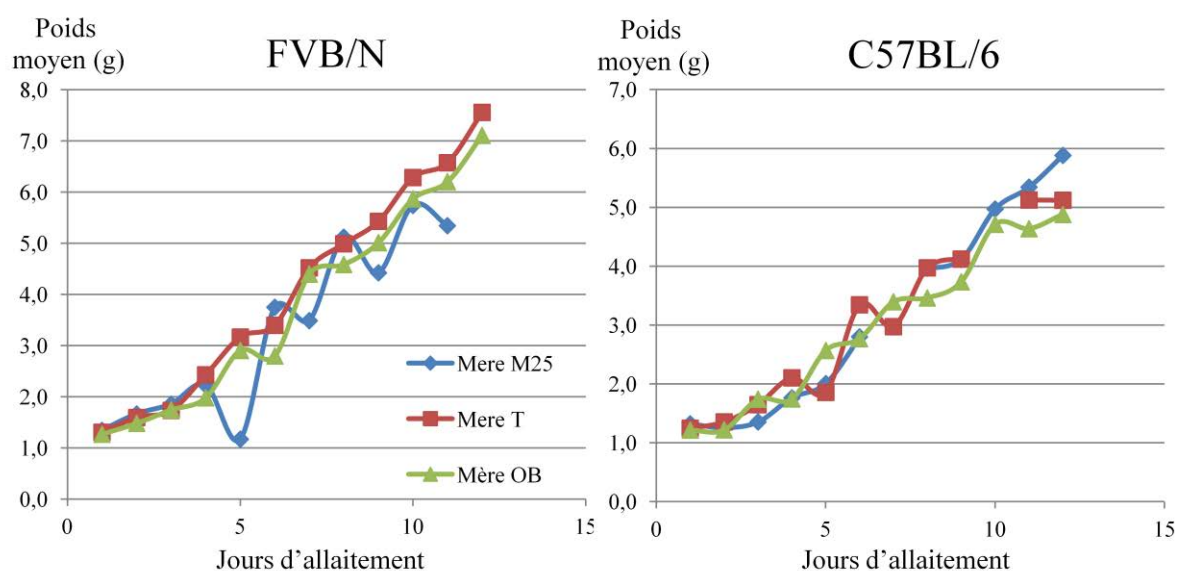


Figure 39 : Croissance des souris de la cohorte 2, de la naissance au sevrage, en fonction de l'effet *in utero* ou de l'alimentation maternelle

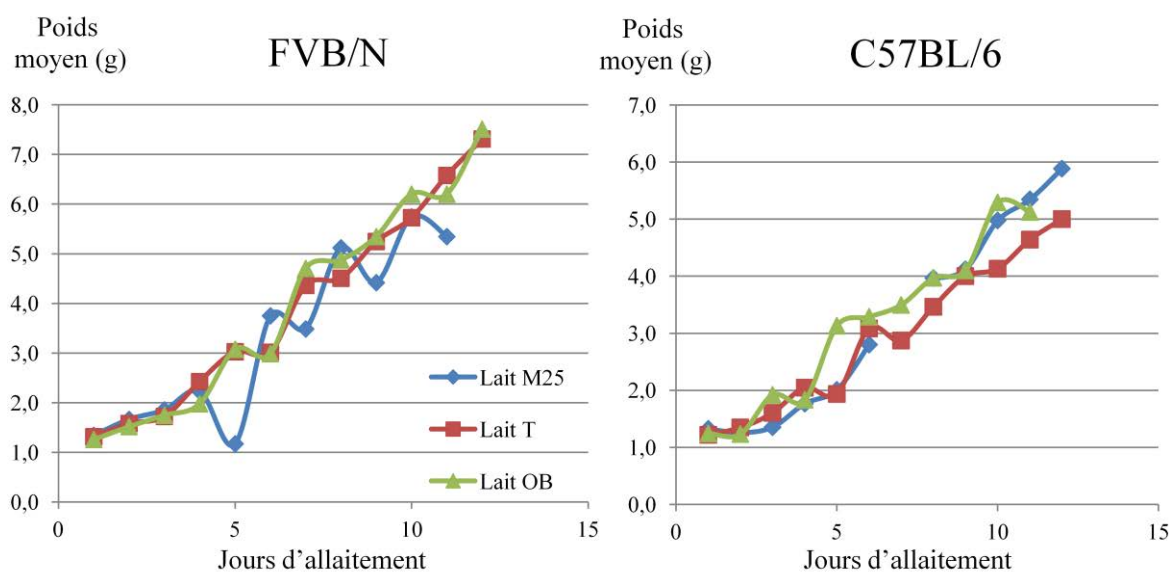


Figure 40 : Croissance des souris de la cohorte 2, de la naissance au sevrage, en fonction du lait ingéré

La croissance des petits est représentée sur les figures 38 et 39. Cette croissance a été évaluée en fonction d'une part, de l'alimentation maternelle pendant la gestation (effet maternel, figure 39) et, d'autre part, du lait ingéré pendant la période d'allaitement (effet lait, figure 40). Le nombre de petits de chaque groupe ne permettant pas de réaliser une représentation graphique en fonction de chacune des variables pour chaque lignée, les représentations ont été faites séparément en ne prenant en compte qu'une variable à chaque fois.

La figure 39 illustre la croissance des souriceaux par la mesure du poids moyen, en fonction de l'effet maternel et la figure 40, en fonction de la nature du lait absorbé. Les écarts types étant très importants, ils ne figurent pas sur les courbes afin d'en faciliter la lisibilité. Cependant des analyses statistiques réalisées à l'aide de modèles prenant en compte les deux variables « mère » et « lait » simultanément en fonction du temps, ne montrent aucune différence significative de l'effet maternel, ni de l'effet du lait sur la croissance des souriceaux durant la période d'allaitement, quelle que soit la lignée considérée.

3.2.2. Effets combinés lait + régime sur la croissance et le métabolisme

3.2.2.1. Courbes de croissance

La croissance des souris de la cohorte 2 a été évaluée par la prise de poids des individus, à partir de la mise sous régime OB à 3 semaines d'âge, en ne prenant en compte l'effet sexe que pour la lignée FVB/N, en raison d'un nombre d'animaux réduit dans la lignée C57BL/6. Les analyses statistiques ont également été réalisées grâce à un modèle d'analyse de mesures répétées, en tenant compte de l'effet du lait en fonction du temps et de l'effet sexe uniquement dans le cas de la lignée FVB/N (figure 41).

L'analyse des résultats de croissance des souris de la cohorte 2, alimentées par un régime OB depuis le sevrage montre que la courbe représentant la croissance des souris ayant consommé un lait OB est située au-dessus de celle des souris ayant consommé un lait T, quelle que soit la lignée. Cependant les analyses statistiques réalisées sur ces résultats ne montrent aucune différence significative concernant l'effet du lait sur la croissance après le sevrage des individus alimentés par le régime OB, quel que soit le fond génétique considéré. La seule différence mise en évidence concerne l'effet du sexe, où dans la lignée FVB/N, comme attendu, les mâles grossissent et ont un poids supérieur aux femelles.

L'ensemble des résultats, contrairement à ceux observés chez le lapin, montre que dans notre modèle murin, quel que soit le fond génétique, nous n'observons pas d'effet du lait, ni au niveau néonatal, ni à plus long terme, sur la croissance des individus, même lorsque ceux-ci sont nourris avec un régime obésogène.

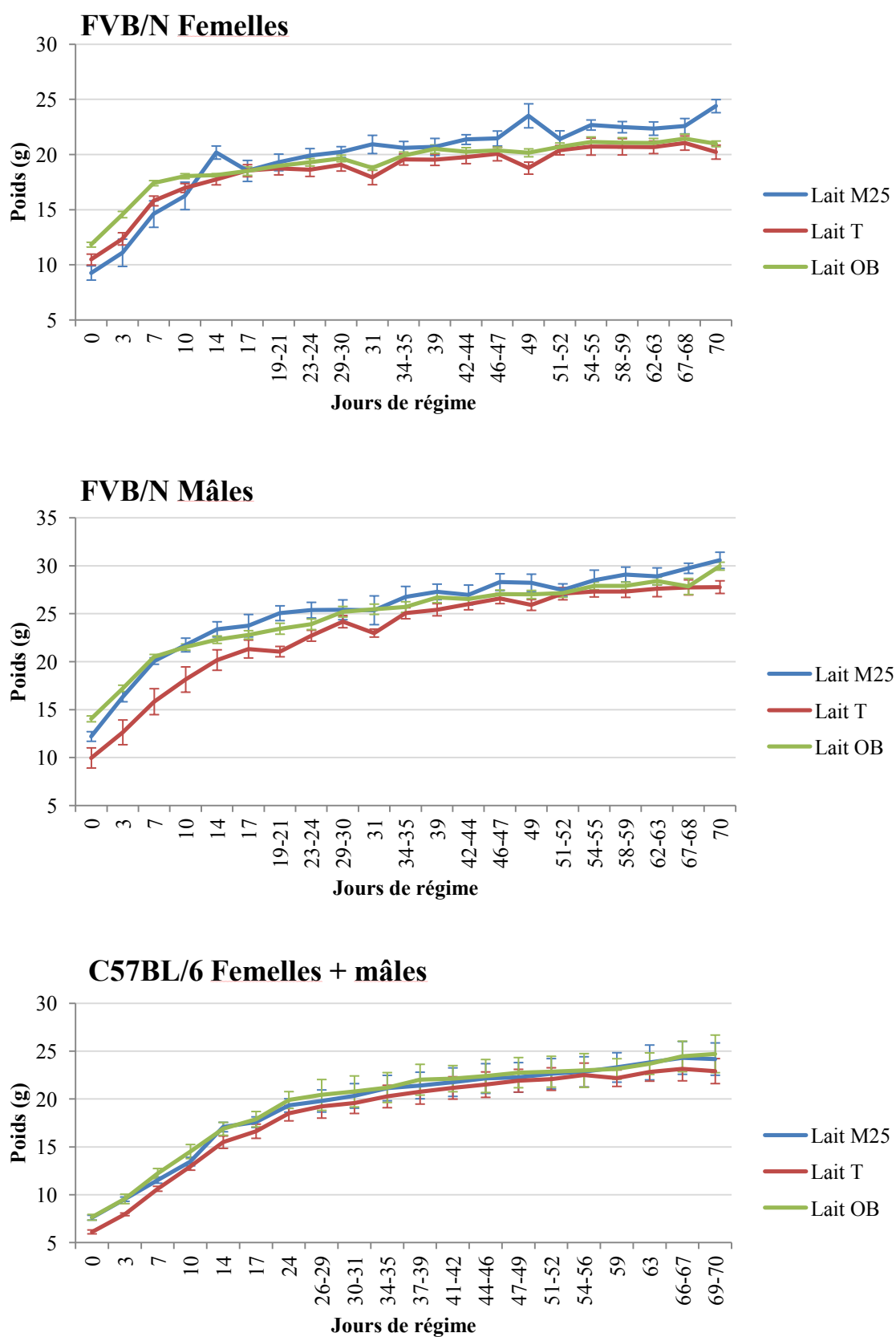


Figure 41 : Croissance des souris de la cohorte 2, à partir du sevrage, en fonction du lait ingéré

3.2.2.2. Etude des paramètres métaboliques

La mesure des paramètres métaboliques a été réalisée sur les souris de la cohorte 2 après 70 jours de régime OB en fonction du lait ingéré et en fonction du sexe, dans le cas de la lignée FVB/N. L'ensemble des mesures est représenté dans la figure 42.

On observe que la triglycéridémie constitue le paramètre le plus variable en fonction du lait ingéré. En effet, chez les souris de fond génétique FVB/N, la concentration sérique en triglycérides est plus élevée chez les souris ayant ingéré un lait OB que chez celles allaitées avec un lait T et/ou M25. Cette différence est significative aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Lignée FVB/N mâles/lait M25 $1,12 \pm 0,10$ g/l vs mâles/ lait T $0,80 \pm 0,07$ g/l, $P=0,025$; mâles/lait M25 $1,12 \pm 0,10$ g/l vs mâles/ lait OB $1,69 \pm 0,14$ g/l, $P=0,020$; mâles/lait T $0,80 \pm 0,07$ g/l vs mâles/ lait OB $1,69 \pm 0,14$ g/l, $P=1,10^{-5}$; femelles/lait M25 $1,61 \pm 0,14$ g/l, femelles/ lait T $2,17 \pm 0,40$ g/l, femelles/ lait OB $2,86 \pm 0,31$ g/l ; femelles/lait M25 vs femelles/ lait OB $P=0,003$; lignée C57BL/6 lait M25 $1,31 \pm 0,24$ g/l, lait T $0,97 \pm 0,17$ g/l, lait OB $1,15 \pm 0,22$ g/l). *A contrario*, aucune différence n'est observée concernant la cholestérolémie de ces animaux. Seule une diminution de la glycémie à jeun des mâles FVB/N allaités avec un lait OB, par rapport à ceux nourris avec un lait T est observée (lait M25 $0,97 \pm 0,12$ g/l, lait T $1,17 \pm 0,09$ g/l vs lait OB $0,83 \pm 0,04$ g/l, $P=0,001$) alors qu'aucune variation n'a été mise en évidence chez les femelles (lait M25 $1,61 \pm 0,19$ g/l, lait T $1,46 \pm 0,05$ g/l, lait OB $1,62 \pm 0,21$ g/l). Concernant le fond génétique C57BL/6, on n'observe pas de variation des paramètres métaboliques mesurés, par rapport au groupe des souris allaitées avec un lait M25, quels que soient le lait ingéré et le métabolite sérique considéré.

Ces résultats illustrent les effets d'une alimentation néonatale couplée à un régime obésogène sur les paramètres métaboliques. Il semble que le paramètre le plus affecté soit la triglycéridémie, probablement liée à la forte teneur en graisse du régime OB qui peut se répercuter sur la teneur et la composition en acides gras du lait OB. On observe également que les différents fonds génétiques n'ont pas les mêmes susceptibilités quant aux effets de l'alimentation sur les paramètres métaboliques, bien qu'aucun d'entre eux ne montre de prise de poids augmentée en fonction du lait ingéré.

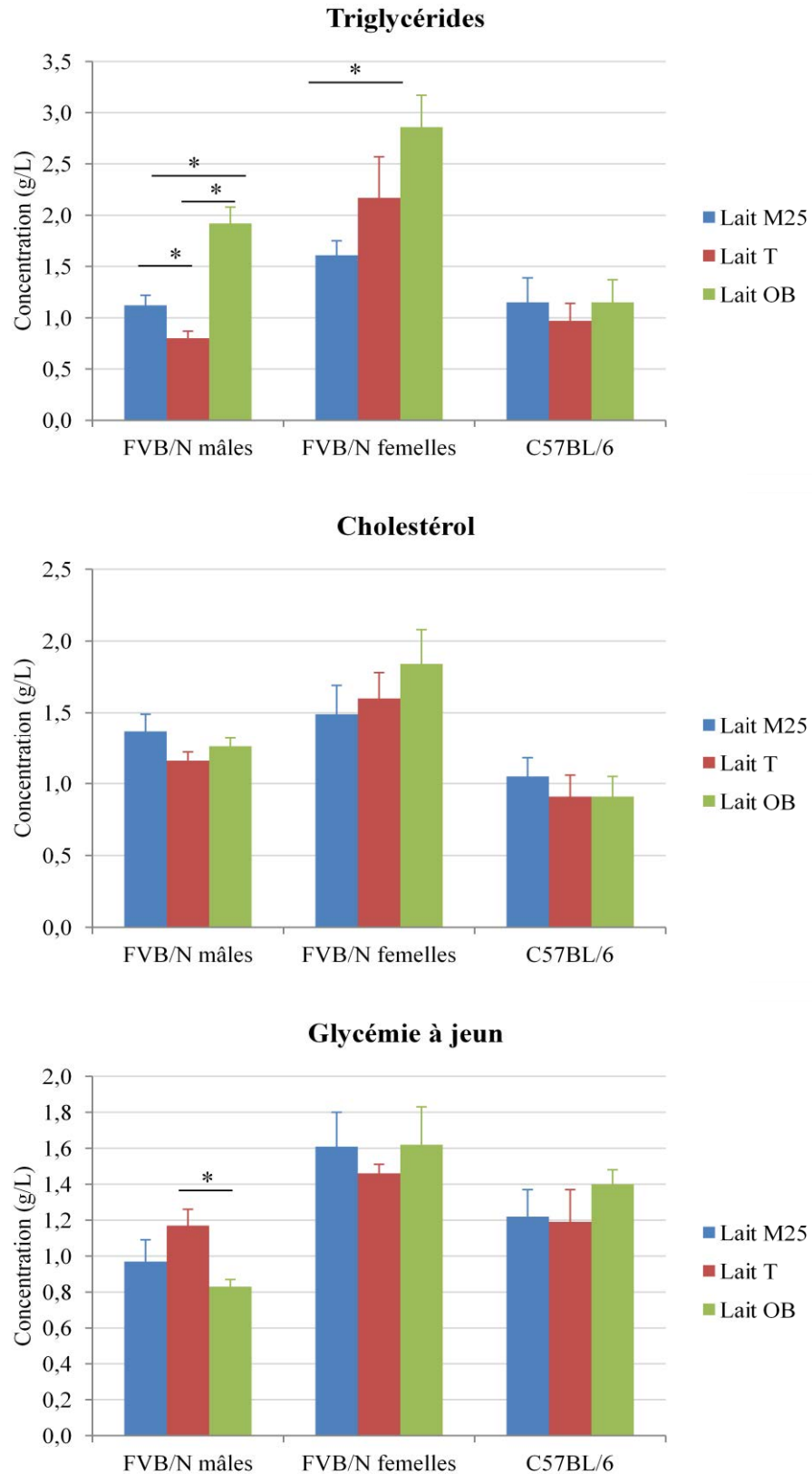


Figure 42 : Dosages sériques des triglycérides, cholestérol et glucose des deux lignées de la cohorte 2

L'astérisque désigne une différence significative entre les groupes ($p \leq 0.05$).

3.2.3. Effets sur le phénotype mammaire à mi-gestation

Des montages *in toto* ont été réalisés à 12 jours de gestation sur les souris de la cohorte 2, nées de mères alimentées avec le régime T, nourries durant la période néonatale soit avec un lait T soit avec un lait OB, puis nourries avec le régime OB. Des femelles issues de mère nourries avec l'aliment M25, et ayant reçu exclusivement une alimentation M25 ont également été utilisées afin d'illustrer un développement mammaire de référence dans chacun des fonds génétiques utilisés.

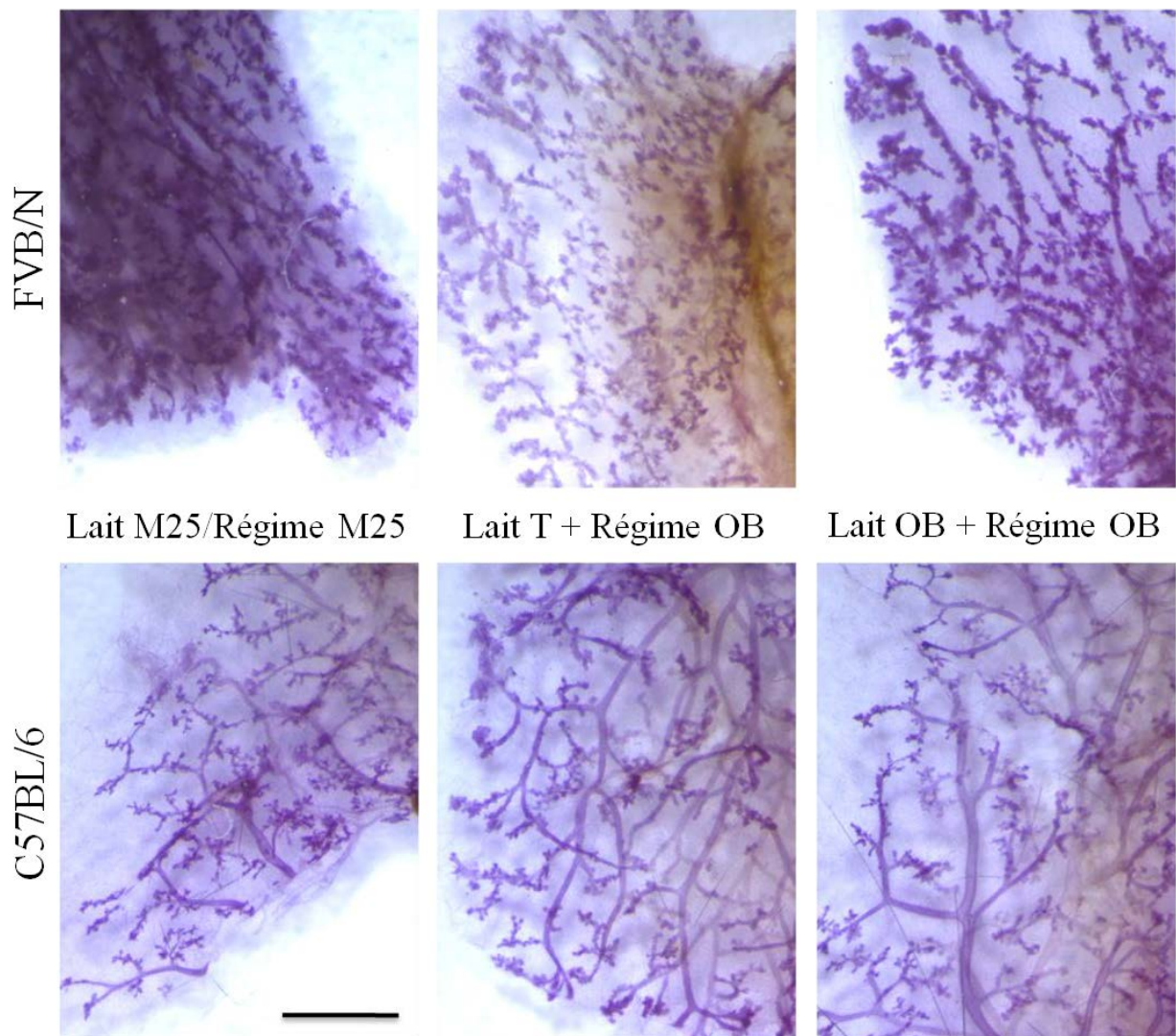


Figure 43 : Montages *in toto* représentatifs de glandes mammaires à 12 jours de gestation de souris de la cohorte 2

Barre d'échelle : 1mm

Comme attendu, on retrouve dans le cas des animaux de la cohorte 2 nourris avec une alimentation M25, un développement mammaire à mi-gestation comparable à celui observé chez les animaux de la cohorte 1. De la même manière, les glandes mammaires des animaux FVB/N présentent des canaux plus larges ainsi qu'un développement lobulo-alvéolaire plus important que les glandes mammaires des animaux C57BL/6. L'alimentation avec un régime OB ne semble pas altérer le développement de la glande mammaire à mi-gestation quelle que soit l'alimentation des animaux durant la période néonatale, contrairement aux observations réalisées chez le lapin. Le régime OB n'a donc pas induit l'état métabolique attendu.

Ces résultats devront cependant être confirmés par l'analyse microscopique de coupes histologiques de tissu mammaire pour chaque fond génétique et pour chaque caractère étudié, à savoir : la mère, le lait et le régime. De plus, à l'instar des animaux de la cohorte 1, l'étude du phénotype mammaire à mi-gestation sera complétée par l'analyse de l'expression des protéines du lait ainsi que celle de la leptine et de ses récepteurs.

3.3. Discussion

Le travail que nous avons réalisé vise à caractériser les effets d'un régime à forte teneur en graisses et en sucres, administré dès la puberté, sur la croissance et le développement mammaire à mi-gestation chez deux lignées de souris. Les résultats que nous avons obtenus ne montrent pas de différence significative du poids et peu de variations des paramètres métaboliques, durant les 70 premiers jours de régime quel que soit le fond génétique et le régime administré au moment de la puberté. Nous avons ensuite évalué l'influence de ces régimes sur le développement de la glande mammaire. Dans chacune des lignées étudiées, le régime ne semble pas apporter de modifications morphologiques visibles sur le développement mammaire à mi-gestation, malgré une augmentation significative de l'expression de la caséine $\alpha S1$ dans le tissu mammaire des souris FVB/N alimentées avec le régime OB. Aucune différence significative de l'expression de la leptine dans la glande mammaire n'a pu être mise en évidence. Nous avons également voulu caractériser l'effet d'un allaitement par une nourrice soumise à une alimentation obésogène, sur la croissance et le développement mammaire, dans les mêmes lignées de souris. Contrairement à ce que nous avons observé chez le lapin, l'ensemble des résultats montre que quel que soit le fond

génétique, le lait ingéré pendant la période néonatale n'induit pas d'effet sur la croissance des individus, même lorsque ceux-ci sont nourris avec un régime obésogène. Nous avons également tenté d'analyser les conséquences d'un allaitement par une nourrice soumise à un régime OB, couplé à un l'ingestion d'un régime obésogène sur les paramètres métaboliques. Il semble que le paramètre le plus affecté soit la triglycéridémie, probablement liée à une augmentation de la teneur en graisses du régime OB qui peut se répercuter sur la teneur et la composition en acides gras du lait OB. Cependant, les différents fonds génétiques n'ont pas la même sensibilité à l'alimentation néonatale lorsqu'on considère les paramètres métaboliques, bien qu'aucune prise de poids ne soit observée en fonction du lait ingéré. Enfin, dans nos modèles murins, l'alimentation avec un régime OB ne semble pas altérer le développement de la glande mammaire à mi-gestation quelle que soit l'alimentation des animaux durant la période néonatale, contrairement aux observations réalisées chez le lapin.

Les effets de divers régimes de composition en graisses et en sucres variées ont fait l'objet de nombreux travaux : des régimes appelés régime standard, régime d'élevage ou régime témoin correspondant aux besoins nutritionnels de l'espèce, dont la teneur en graisses est d'environ 3 à 5% ; des régimes appelés hypergras dont la teneur en graisses peut varier de 15 à 60% et des régimes dit obésogènes dont la teneur en graisses et en sucres est élevée, allant respectivement de 15 à 40% pour l'apport lipidique et de 40 à 70% pour l'apport en sucres à fort pouvoir obésogène. La comparaison des effets induits par un régime obésogène, à forte teneur en sucres et en graisses (respectivement 56% et 18%) ou un régime hypergras (respectivement 34% de sucres et 35% de graisses), a été réalisée après administration pendant 12 semaines de ces régimes à des souris mâles adultes de la lignée C57BL/6 (Higa *et al.* 2014). Les résultats obtenus ne montrent pas de modification du poids corporel, mais une augmentation de la graisse viscérale, plus importante dans le cas d'un régime obésogène que dans celui d'un régime hypergras. Ces résultats sont en accord, au moins concernant la prise de poids, avec ceux que nous obtenons avec un régime composé de 16% de graisses et de 56% de sucres, chez des femelles, montrant ainsi une absence de dimorphisme sexuel dans la lignée C57BL/6. De plus, un régime à forte teneur en graisses et en sucres induit une augmentation des taux sériques de leptine, de triglycérides, d'insuline et de cholestérol, associée à une hyperphagie et une hypertrophie adipocytaire, alors que la consommation d'un régime hypergras induit préférentiellement une modification des profils lipidiques (Higa *et al.* 2014).

Les effets des régimes alimentaires dépendent donc de la composition de ces régimes, des espèces considérées, comme illustré lors de nos études chez les lapins et les souris, mais ils dépendent également des différentes capacités olfactives et neurosensorielles capables de modifier le comportement alimentaire, cette capacité pouvant elle-même être modifiée chez des animaux obèses (Tucker *et al.* 2012). Bien que notre étude n'ait pas pris en compte cet aspect, des études visant à étudier l'appétence de nos lignées de souris pour les différents régimes, ou des souriceaux pour les laits issus de différentes nourrices pourraient être envisagées, en collaboration avec l'unité de Neurobiologie de l'Olfaction de l'INRA de Jouy en Josas.

La comparaison des résultats que nous avons obtenus sur la croissance des lignées de souris après 70 j d'un régime obésogène avec les données de la littérature, indique que chez la souris, l'obésité est induite de manière beaucoup plus efficace par l'administration d'un régime hypergras que par celle d'un régime obésogène, dont la teneur en graisses est souvent diminuée par rapport à celle des régimes hypergras, en faveur d'un apport en sucres. Cependant Samuelsson montre que lorsqu'on administre un régime obésogène (graisse 16% et sucres 33%) à des souris femelles de la lignée C57BL/6 à l'âge adulte, on peut tout de même induire un gain de poids ainsi qu'une adiposité (Samuelsson *et al.* 2008). Parallèlement à ce gain de poids, une diminution des taux de reproduction a été décrite chez les souris nourries avec un régime hypergras (Flint *et al.* 2005). Bien que lors de nos travaux les taux de reproduction des femelles soumises à une alimentation obésogène soient restés suffisamment élevés (de l'ordre de 75%) pour ne pas conclure à une infertilité, nous avons observé une diminution du nombre de petits par portée chez les femelles C57BL/6 nourries avec le régime OB, dans le cas d'accouplement précédé d'une superovulation.

L'influence d'un apport différentiel de lipides par l'alimentation entre un régime pauvre en graisses (12%) et un régime à teneur en graisses élevée (46%) a été évaluée sur le phénotype mammaire et la lactation. Des travaux montrent que l'administration d'un régime hypergras, dès l'âge adulte à des souris induit, à mi-gestation un défaut de branchement des canaux et un faible développement lobulo-alvéolaire. Chez ces souris, la lactation est également fortement impactée par le régime puisqu'on observe une diminution de l'expression des protéines du lait associée à une accumulation de lipides au niveau des cellules épithéliales mammaires, rendant la production de lait plus faible (Flint *et al.* 2005). Ces travaux ont été complétés par ceux de Whalig qui ont montré que la consommation d'un régime hypergras chez la souris, altérerait le

métabolisme maternel, induisant la production d'un lait pauvre en lipides (Wahlig *et al.* 2012). Les causes de cette diminution du contenu en graisses du lait de mères obèses, a été attribué d'une part, à une diminution sélective de l'activité d'enzymes du métabolisme dans les cellules mammaires et, d'autre part, à une diminution de la synthèse d'acides gras dans les cellules épithéliales mammaires (Saben *et al.* 2014). Bien que la teneur en graisses de notre régime, moins importante que celle des régimes hypergras précités, n'ait pas induit de phénotype anthropométrique des mères, la variation de cette teneur entre les régimes T et OB pourrait néanmoins avoir affecté, de manière plus discrète, la composition lipidique du lait. Cette analyse est actuellement en cours.

L'obésité est une maladie hautement héréditaire, mais également régie par des interactions complexes entre la génétique et l'environnement. Chez l'homme, des études génétiques montrent l'existence d'une susceptibilité génétique à l'obésité, bien que l'importance des facteurs environnementaux ne soit pas pour autant remise en cause (Speakman *et al.* 2011). Une étude a permis d'évaluer l'obésité induite par un régime hypergras et hypersucré sur une centaine de lignées de souris. Les auteurs montrent que l'administration d'un régime obésogène engendre des phénotypes différents dépendant fortement du fond génétique et peu de la prise alimentaire (Parks *et al.* 2013). Les auteurs estiment respectivement à 20 et 30% la proportion de prise de poids sous régime obésogène des lignées FVB/N et C57BL/6. La différence entre ces données et les résultats que nous avons obtenus, souligne l'importance des facteurs environnementaux, comme par exemple la fenêtre nutritionnelle. L'importance du fond génétique lorsqu'on utilise la souris comme modèle a également été soulignée en comparant les effets d'une obésité sévère, induite par une déficience génétique en leptine, entre les lignées FVB/N et C57BL/6. Bien que les deux lignées se comportent de manière similaire à l'égard du gain de poids et de l'adiposité, des différences importantes ont été observées concernant la sévérité du diabète induit chez ces animaux, leur résistance à l'insuline et leur réponse métabolique au jeûne (Haluzik *et al.* 2004).

Des travaux visant à apprécier l'influence d'une alimentation dérégulée durant la puberté sur le développement mammaire, montrent que les effets observés peuvent être totalement contradictoires d'un fond génétique à un autre. En effet si les souris C57BL/6 prennent du poids et montrent un retard dans le développement mammaire dans ces conditions, les souris BALB/c, quant à elles, ne présentent aucune variation de leur masse corporelle et présentent un développement mammaire accéléré par rapport à des souris nourries avec un régime

témoin (Olson *et al.* 2010). Ceci peut être expliqué par l'engorgement des adipocytes lors d'un apport de graisses excessif, qui va moduler la sécrétion locale d'adipokines, pouvant influencer fortement la croissance et la différenciation du tissu mammaire, durant la puberté. Ce phénomène est fortement dépendant du fond génétique. En effet, il a été montré que les différences observées dans l'allongement et le branchement des canaux mammaires entre différentes souches de souris, sont dépendantes de signaux venant du stroma mammaire (Naylor & Ormandy 2002).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Des régimes riches en sucrose, dextrose, fructose, graisses saturées ou toutes les combinaisons possibles de ces composés, provoquent d'importantes modifications du métabolisme et induisent diabète, gain de poids et adiposité. Chez le rat, des études ont montré qu'un régime à forte teneur en gras et en sucres, appelé régime obésogène ou cafétéria induit un syndrome métabolique plus sévère qu'un régime hypergras (Sampey *et al.* 2011). Ces résultats concordent avec ceux obtenus chez la souris (Higa *et al.* 2014). Il semblerait donc que ces régimes de type cafétéria, conduisent chez le rongeur à un syndrome métabolique sévère, alors que les régimes hypergras semblent plus efficaces pour induire l'obésité. Enfin, les régimes hyper-sucrés ou hyper-salés induisent le développement d'une hypertension (Sampey *et al.* 2011; Higa *et al.* 2014).

Nous avons montré qu'un régime obésogène administré avant la puberté à des lapines, augmente l'adiposité et perturbe le développement de la glande mammaire, confirmant d'une part, le rôle critique joué par l'alimentation sur la croissance et la différenciation de cet organe déjà décrit chez la souris (Flint *et al.* 2005; Kamikawa *et al.* 2009) et, d'autre part, l'importance de la puberté comme fenêtre de sensibilité nutritionnelle (Hue-Beauvais *et al.* 2011). Les résultats que nous avons obtenus chez les souris ne sont que partiellement en accord avec ceux obtenus chez la lapine ainsi qu'avec certaines données déjà décrites chez les rongeurs. En effet, notre régime obésogène n'a pas entraîné de modifications métaboliques importantes excepté une augmentation de la triglycémie. Cependant l'adiposité de nos souris nourries avec ce régime n'a pas pu être évaluée, tout comme leur tension artérielle. Parmi les paramètres pouvant expliquer cette différence, on peut citer la composition du régime. En effet les régimes cafétéria décrits dans la littérature associent un excès de sucres et de graisses avec un excès de sel et une forte diminution des fibres digestibles. Dans nos protocoles, les teneurs en sel et en fibres sont identiques entre les régimes T et OB. Par ailleurs, chez les rongeurs, la composante lipidique des régimes, avant d'atteindre l'induction d'une hyperadiposité corporelle allant jusqu'à l'obésité, peut atteindre jusqu'à 70% de la composition totale dans certains régime qualifiés d'hypergras.

Nos résultats montrent une augmentation des acides gras à chaîne longue et une diminution des acides gras à chaîne moyenne (caractéristiques de la composition du lait de lapines) dans le lait des lapines alimentées avec un régime T ou OB depuis la puberté, comme précédemment observé chez le rat (Rolls *et al.* 1986). Au cours de ce travail, nous avons montré que les lapins alimentés avec un lait issu de mères ayant reçu un régime obésogène

présentaient un poids et une adiposité supérieurs à ceux nourris avec un lait témoin. De plus, combiné à un régime obésogène, ce lait dont la composition est modifiée, peut induire un développement anormal de la glande mammaire. Chez la souris, lorsqu'un régime hypergras est administré à des mères, pendant un période couvrant la gestation et la lactation, la descendance développe une obésité caractérisée dès le sevrage (Howie *et al.* 2009). Des résultats similaires ont été obtenus lorsqu'on alimente des souris, avant l'accouplement et jusqu'à la fin de la lactation avec un régime obésogène. Dans ce cas, les petits souffrent d'hyperphagie et d'une réduction de leur activité locomotrice en relation avec l'augmentation de poids, mais également de problèmes métaboliques, cardiovasculaires et cérébraux (Samuelsson *et al.* 2008; Niculescu & Lupu 2009). Ces observations ont été réalisées chez les descendants à l'âge adulte, même lorsque ceux-ci étaient nourris avec un régime équilibré, ce qui illustre les dommages engendrés par une alimentation maternelle inadaptée, lors des périodes développementales critiques que sont les périodes natale et néonatale, sur la santé ultérieure du jeune. Il a par ailleurs été montré que la consommation, à elle-seule, d'un lait, dont la composition est modifiée par l'alimentation maternelle, par des souriceaux mâles de la lignée C57BL/6, entraîne une augmentation de poids corporel au sevrage ainsi que l'apparition de symptômes caractéristiques d'un syndrome métabolique, tels qu'une obésité, une hyperlipidémie, une hypercholestérolémie et une hyperinsulinémie (Tsuduki *et al.* 2013). Chez le rat, l'utilisation d'un modèle de portée réduite permettant l'ingestion d'une plus grande quantité de lait maternel, permet d'induire à court et long terme chez la descendance un syndrome métabolique proche de celui décrit chez l'homme, une hyperphagie, un gain de poids et de masse grasse mais également des perturbations de l'organisation de certaines populations neuronales de l'hypothalamus impliquée dans la régulation de la prise alimentaire (Plagemann *et al.* 1999). Ces résultats confortent l'importance de l'alimentation maternelle durant la lactation, qui à elle-seule semble pouvoir affecter la santé à long terme des petits. Ils sont à rapprocher de ceux publiés concernant l'homme, puisqu'un apport énergétique excessif durant la gestation et la lactation induit une augmentation du risque de développer un syndrome métabolique chez l'enfant, sans toutefois pouvoir distinguer les effets *in utero* de ceux dus à l'allaitement (Sen *et al.* 2012). Notre travail se poursuit actuellement par une étude multigénérationnelle, afin d'évaluer l'effet du phénotype mammaire altéré de nos lapines nourries avec un lait OB et un régime OB sur leurs paramètres de reproduction et leur capacités laitières. Cette étude comprend également l'analyse fine de la composition du lait, tant sur le plan lipidique que sur le plan protéique.

Ce travail est le premier à montrer les effets d'un lait issu d'une mère ayant reçu une alimentation obésogène, chez le lapin et apporte des arguments à l'hypothèse selon laquelle la période néonatale constitue une fenêtre critique pour le devenir à l'âge adulte. En effet, le lait ingéré durant la période néonatale pourrait influencer sur la mise en place de la régulation centrale du métabolisme énergétique. On pourrait ainsi envisager de prévenir certaines conséquences néfastes, telles que l'augmentation excessive de l'adiposité, en intervenant sur l'alimentation du jeune durant la période néonatale. Ces résultats soulèvent de nouvelles questions concernant l'utilisation des fenêtres de susceptibilité à une alimentation altérée pour la restauration d'un phénotype normal. En effet, l'alimentation des femelles hyperadipeuses durant la lactation pourrait être un levier pour restaurer chez la descendance issue de mères obèses, une croissance normale et pour limiter les altérations observées lors du développement mammaire. Des résultats contradictoires ont été rapportés chez les rongeurs concernant la réversibilité d'une obésité induite par l'alimentation. En effet, alors que certaines études observent une obésité permanente chez le rat (Rolls *et al.* 1980; Llado *et al.* 1991), d'autres ont montré que cette obésité pouvait être plus ou moins réversible (Harris & Martin 1989) en fonction de la durée de l'alimentation et l'ampleur du gain de poids, facteurs qui sont souvent confondus en raison des différents degrés d'obésité créés par des variations du temps et de la période d'exposition au régime hypercalorique (Hill *et al.* 1989; Wattez *et al.* 2014). Bien qu'aucune étude utilisant le modèle lapin n'ait été réalisée pour observer les effets d'un retour à une alimentation équilibrée après l'établissement d'une obésité, des études chez la souris suggèrent la possibilité d'une réversibilité des effets métaboliques induits par l'alimentation (Guo & Jen 1995). Dans cette perspective nous envisageons de nourrir des lapereaux nés de mères obèses avec du lait T afin d'étudier les effets *in utero* dus à l'obésité maternelle mais également le potentiel d'une alimentation néonatale à restaurer un phénotype.

Chez les mammifères, l'alimentation du jeune dépend exclusivement du lait, liquide complexe dont les effets vont bien au-delà de sa valeur nutritionnelle. Le lait confère au nouveau-né des avantages d'ordre protecteur et adaptatif, à travers des facteurs tels que l'immunité, des cellules lymphoïdes et non-lymphoïdes, mais également des antigènes (McClellan *et al.* 2008). Ces facteurs sont non seulement transférés de la mère au fœtus via le placenta pendant la grossesse dans les espèces avec un placenta hémochorial (comme les humains, les rongeurs et les lapins), mais aussi de la mère au jeune via le colostrum et le lait pendant l'allaitement. Dans ce contexte, les rôles joués par les composés bioactifs du lait (incluant des hormones, les cytokines et les microARN) dans le soutien du développement néonatal sont d'une importance

considérable. Une des perspectives de notre projet est d'analyser la teneur en leptine du lait de lapine et de confirmer le rôle de la leptine du lait. Ariele Gertler (Université de Jerusalem, Israël) avec qui le laboratoire a établi une collaboration de longue date, a récemment développé des antagonistes compétitifs de la leptine (Carre *et al.* 2014). L'effet de ces antagonistes a été testé chez le rat afin de démontrer le rôle joué par la leptine néonatale, suite à une alimentation hypergrasse, sur la croissance et le développement osseux du jeune (Beltrand *et al.* 2012). L'administration de tels antagonistes, à des lapereaux pendant la période néonatale, permettrait d'apporter des informations déterminantes quant au rôle organogénique de cette cytokine, en particulier dans la glande mammaire.

L'effet d'une alimentation dérégulée à la puberté sur le développement mammaire n'a pu être mis en évidence par différentes études qu'en utilisant des régimes hypergras (entre 40 et 57%). Toutefois et à l'inverse de ce que nous observons chez le lapin, lorsqu'un tel régime est administré avant la puberté, on observe chez les souris adultes un développement mammaire moins important que chez les souris témoins, avec une fréquence de branchement des canaux plus faible et une diminution importante des cellules myoépithéliales (Kamikawa *et al.* 2009). Il est intéressant de noter que les conséquences du régime hypergras, administré après la puberté, ne sont observables qu'à partir de la mi-gestation, où le développement lobulo-alvéolaire est retardé, ce qui entraîne une production de lait réduite (Flint *et al.* 2005). Ces résultats suggèrent qu'un régime hypergras induit un retard dans le développement mammaire chez la souris, mais que celui-ci n'est visible qu'à plus ou moins long terme, en l'occurrence pendant la phase de prolifération de la gestation. L'ensemble de ces résultats soulignent l'existence, quelle que soit l'espèce, d'une fenêtre nutritionnelle entourant la puberté, durant laquelle les conséquences d'une alimentation dérégulée sont majoritairement visibles et ont des répercussions importantes sur le développement mammaire ultérieur (Olson *et al.* 2010). Ces différences sont soit liées à l'espèce dans la mesure où le métabolisme du lapin est différent de celui de la souris, soit aux différences entre les régimes hypergras et obésogène, soit à l'association des deux.

La période et la durée de l'administration des régimes constituent également des variables majeures dans l'évaluation des effets à long terme. Nous avons déterminé l'effet de la nutrition pendant la période néonatale et pré-pubertaire sur le phénotype mammaire adulte, en montrant que les lapins alimentés dès la naissance avec du lait issu de femelles nourries avec le régime OB et soumis ultérieurement à un régime OB présentent un développement anormal

de la glande mammaire. En effet, les canaux mammaires étaient élargis et remplis avec des produits de sécrétion abondants. De plus, les structures alvéolaires sécrétoires étaient désorganisées et caractérisées par un élargissement important de la lumière. Les cellules épithéliales mammaires contenaient de nombreuses gouttelettes lipidiques de taille importante et comportaient des digitations de la membrane apicale ainsi que des espaces intercellulaires remplis de micelles de caséines. En effet, l'alimentation maternelle ayant un impact sur la composition du lait, il est possible que les différents facteurs contenus dans ce lait et qui varient suivant l'alimentation maternelle et l'état métabolique de la mère, soient capables de moduler le développement du nouveau-né. Il est maintenant urgent de déterminer les facteurs contenus dans le lait et responsables des effets à long terme sur la croissance et l'adiposité de la descendance, décrits au cours de nos études. La leptine et/ou les acides gras, pourraient constituer à cet égard des candidats pertinents. Les effets des acides gras du lait font actuellement l'objet de différentes études et sont au centre de travaux impliquant différents régimes et différentes lignées de souris (Saben *et al.* 2014). Bien qu'il y ait beaucoup d'études sur le rôle des acides gras alimentaires dans le risque de cancer, peu d'étude se sont concentrées sur le rôle de ces acides gras sur le développement mammaire, même si le rôle des acides gras polyinsaturés (n-3) issus de l'alimentation du jeune, a été mis en évidence, chez la souris, au niveau du développement mammaire durant la puberté (Anderson *et al.* 2014).

La glande mammaire est un organe dynamique, qui subit des cycles de prolifération cellulaire, de différenciation et d'apoptose pendant la vie adulte. Différentes hormones, parmi lesquelles la leptine, régissent finement tous ces mécanismes. On connaît la leptine comme une cytokine essentiellement produite par des adipocytes et impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire. Toutefois, la leptine intervient également dans beaucoup de processus physiologiques, particulièrement la prolifération et la différenciation cellulaires. Nous avons analysé l'expression de cette cytokine dans la glande mammaire de lapine pendant la gestation et la lactation. Nous avons montré que les transcrits codant la leptine sont synthétisés au niveau du tissu sécréteur mammaire, tant pendant la gestation que pendant la lactation (Koch *et al.* 2013). De même, nous avons mis en évidence une localisation de la protéine au niveau des cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires pendant la lactation, période pendant laquelle la synthèse de leptine est maximale. L'expression de la leptine dans les cellules myoépithéliales pendant la lactation a également été décrite dans le cas de l'espèce ovine (Bonnet *et al.* 2002b) et bovine (Bartha *et al.* 2005).

Cependant, contrairement aux ruminants, chez le lapin, la synthèse de leptine n'est pas exclusivement myoépithéliale. Nos résultats sont en accord avec la synthèse de leptine mammaire rapportée chez la femme (Smith-Kirwin *et al.* 1998), la souris (Aoki *et al.* 1999), la brebis (Bonnet *et al.* 2002b) et la vache (Bartha *et al.* 2005). Cependant, la cinétique de cette expression diffère selon les espèces animales considérées. Dans les modèles murin et ovin, l'expression de la leptine mammaire est significativement plus basse pendant la lactation que pendant la gestation (Aoki *et al.* 1999; Bonnet *et al.* 2002b) alors que chez la lapine cette cinétique est inversée. Ces différences inter-espèce pourraient être liées à des profils endocrines spécifiques de chaque espèce et donc à des régulations hormonales particulières. Concernant l'Ob-R, des études menées chez la souris (Tartaglia *et al.* 1995; Mercer *et al.* 1996; Hoggard *et al.* 1997) et la vache (Bartha *et al.* 2005) ont rapporté la présence de faibles niveaux d'isoforme longue du récepteur de la leptine dans les tissus périphériques, alors qu'elle est fortement exprimée dans le cerveau. Dans la glande mammaire ovine (Laud *et al.* 1999) et bovine (Bartha *et al.* 2005) les deux isoformes de l'Ob-R ont été observées, avec une expression prépondérante de la forme courte chez l'ovin. De plus, la localisation cellulaire des transcrits codant les deux isoformes de l'Ob-R coïncide avec celle des transcrits codant la leptine, à savoir les cellules épithéliales alvéolaires. La cinétique d'expression des ARNm codant l'Ob-R ovin montre une expression faible pendant la fin de la gestation et la lactation et un pic d'expression à mi-gestation, période pendant laquelle commence une phase de prolifération cellulaire intense chez la brebis (Bonnet *et al.* 2002b). Nos travaux montrent que l'expression de la leptine mammaire est augmentée chez les animaux allaités avec le lait OB et soumis au régime OB. En revanche, les niveaux des transcrits codant le récepteur de la leptine ne varient pas chez les lapines qui ont ingéré le lait OB, puis le régime OB (résultats non publiés). Toutefois, une modulation sélective des différentes isoformes du récepteur par l'alimentation reste possible et l'évaluation des quantités relatives de ces isoformes est indispensable avant de conclure.

L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle majeur de la leptine en tant que régulateur local du développement de la glande mammaire. En agissant comme un facteur autocrine et/ou paracrine, la leptine pourrait contribuer à la modulation de la croissance de la glande mammaire et sa différenciation. Ainsi, la leptine influencerait sur le développement mammaire pendant la gestation par l'intermédiaire de son récepteur, fortement exprimé. Pendant la lactation, la sécrétion de leptine dans le colostrum et le lait a déjà été décrite chez la femme (Smith-Kirwin *et al.* 1998), la ratte (Casabiell *et al.* 1997), la vache (Pinotti & Rosi 2006), la

truie (Estienne *et al.* 2000) et la souris (Aoki *et al.* 1999). La leptine contenue dans le lait proviendrait soit d'une synthèse *de novo* par la glande mammaire, soit par transcytose de la leptine sanguine. La concentration de leptine dans le lait varie considérablement selon les espèces (Bonnet *et al.* 2002a). Si nos résultats confirmaient l'enrichissement en leptine du lait chez les mères OB, la présence de leptine dans le lait maternel pourrait soutenir l'hypothèse selon laquelle cette hormone jouerait, via le lait, un rôle dans le développement du nouveau-né et notamment dans la régulation de sa prise alimentaire au niveau central (Kirk *et al.* 2009).

Les études *ex vivo* utilisant des cultures d'organoïdes mammaires, au 11^{ème} jour de gestation, issus de glandes mammaires de lapines nourries depuis la puberté par un régime T ou par un régime OB, ont apporté un point de vue plus mécanistique à nos études. A l'aide de ce système, nous avons mis en évidence, pour la première fois chez le lapin, la présence de récepteurs fonctionnels de la leptine dans ce tissu, phénomène qui se traduit par une activation constitutive de la voie STAT3, probablement due à une synthèse endogène de leptine. Bien que la moyenne des valeurs obtenues ait été inférieure dans le cas des cultures primaires issues de lapines OB, par rapport à celle obtenues avec les cultures issues de lapine T, cette différence n'était cependant pas significative. Ce résultat est à rapprocher avec les données de la littérature qui montrent une leptino-résistance chez les sujets obèses. En effet, dans la majorité des cas, les personnes obèses présentent des taux élevés de leptine circulante qui sont paradoxalement incapables d'induire une réponse adéquate. Cet état pathologique appelé « résistance à la leptine » peut être le résultat soit d'une déficience du transport de l'hormone à travers la barrière hémato-encéphalique, soit d'un défaut de signalisation du récepteur ou encore d'une altération du nombre de récepteurs à la surface cellulaire (Myers *et al.* 2008). Cependant il s'agit là d'une leptino-résistance au niveau central et à ce jour aucune donnée n'apporte d'information sur une éventuelle leptino-résistance au niveau mammaire. Le modèle cellulaire développé dans cette thèse pourrait être utilisé pour tenter de répondre à ces questions.

L'intérêt de l'utilisation de différents modèles animaux dans les études sur l'impact de l'alimentation constitue également une des conclusions de ce travail. En effet, l'administration d'un régime obésogène avant la puberté ou l'ingestion d'un lait ayant une composition altérée, dès la naissance, induit des modifications du développement mammaire et de la

croissance de la descendance, chez les lapins, alors que les deux lignées de souris étudiées ne montrent pas de modifications phénotypiques au niveau de la croissance et du développement mammaire. Après la souris (59,3%) et le rat (17,7%), le lapin est la troisième espèce la plus utilisée comme modèle expérimental (2,8%). La plupart des travaux sur le lapin concernent des modèles de maladies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les dysfonctionnements nerveux ou les cancers ou encore des tests pharmacologiques sur des composés chimiques. La connaissance de la séquence du génome du lapin (Carneiro *et al.* 2014) apporte de nouveaux outils de génomique puisque la distance phylogénique entre le lapin et les primates est la même que celle qui sépare les rongeurs des primates, alors que les séquences géniques du lapin sont plus similaires aux séquences humaines que celles des rongeurs (Graur *et al.* 1996). Dans ce contexte, nous poursuivons nos études dans cette espèce par la caractérisation des effets multigénérationnels d'une alimentation altérée pendant différentes fenêtres du développement. Parallèlement, nous allons continuer à développer le modèle nutritionnel « souris », en ajustant la composition de l'alimentation aux exigences de l'espèce afin d'étudier plus finement les effets de la leptine mammaire dans l'adiposité induite par une alimentation obésogène. L'établissement d'une lignée portant une copie modifiée du gène de l'Ob-R nous permettrait d'étudier les effets de l'inactivation de ce gène de manière inductible, à certaines périodes du développement spécifiquement dans la glande mammaire.

D'après la dernière enquête nationale ObEpi 2012, en France, 15% des adultes et 3.5% des enfants présentent une obésité, 32% des adultes et 14,5% des enfants sont en surpoids, soit un adulte sur deux et un enfant sur cinq. La proportion des personnes en surpoids ou obèses a progressé de 36,7% à 47,3% entre 1997 et 2003, soit une augmentation de 11%. Sur la même période l'obésité morbide a doublé. A l'échelle mondiale, le nombre des cas d'obésité a doublé depuis 1980. Le surpoids concerne 1,4 milliard de personnes de 20 ans et plus, parmi lesquelles plus de 200 millions d'hommes et près de 300 millions de femme sont obèses (OMS 2008). De plus, la fréquence de l'obésité infantile augmente dramatiquement dans la plupart des pays industrialisés, même si en France on observe une stagnation depuis quelques années, et s'étend désormais aussi aux pays en voie de développement, au point d'atteindre près de 40 millions d'enfants de moins de 5 ans. De nos jours, l'obésité et maladies métaboliques qui y sont associées sont des problèmes majeurs de santé publique. Le phénomène est complexe et multifactoriel. Il peut être expliquée à la lumière du concept de programmation au cours du développement, du risque de maladie chronique à l'âge adulte

(DOHaD : Developmental Origins of Health and Disease, (Barker 2004)). Ce concept postule que la période préconceptionnelle débutant à la puberté, la grossesse et la lactation constituent des fenêtres de sensibilité à l'apport nutritionnel. Chez l'homme de nombreux facteurs prédisposant à l'obésité ont été mis en cause, tels que : le poids de naissance, une activité physique faible, une durée de sommeil réduite, l'absence d'allaitement maternel, l'obésité parentale et bien sur une alimentation dérégulée, caractérisée par un apport énergétique journalier très élevé associé à une consommation excessive en graisses et sucres. De nombreuses études utilisant des modèles animaux ont montré une prédisposition au syndrome métabolique (complications associées à l'obésité, telles que la dyslipidémie, la stéatose hépatique, le diabète...) souvent associée à un dimorphisme sexuel, chez la descendance de femelles ayant subi une surnutrition hypercalorique conduisant à une obésité (Buettner *et al.* 2007; Calligaris *et al.* 2013). Toutefois chacun de ces modèles ne peut que reproduire partiellement l'étiologie et les conséquences des maladies métaboliques humaines et de nombreuses questions restent encore ouvertes. Ainsi l'obtention d'un modèle animal bien caractérisé constitue un atout majeur pour l'étude des aspects moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la progression de l'obésité et de ses conséquences.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahima R.S., Dushay J., Flier S.N., Prabakaran D. & Flier J.S. (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* **99**, 391-5.
- Ahima R.S. & Flier J.S. (2000) Leptin. *Annu Rev Physiol* **62**, 413-37.
- Ahima R.S., Prabakaran D. & Flier J.S. (1998) Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* **101**, 1020-7.
- Andersen C.L., Jensen J.L. & Orntoft T.F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**, 5245-50.
- Anderson B.M., MacLennan M.B., Hillyer L.M. & Ma D.W. (2014) Lifelong exposure to n-3 PUFA affects pubertal mammary gland development. *Appl Physiol Nutr Metab* **39**, 699-706.
- Aoki N., Kawamura M. & Matsuda T. (1999) Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. *Biochim Biophys Acta* **1427**, 298-306.
- Arias-Alvarez M., Garcia-Garcia R.M., Rebollar P.G.d.r., Nicodemus N., Millan P., Revuelta L. & Lorenzo P.L. (2010) Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous lactating does fed with high-fibre rearing diets. *Reprod Domest Anim* **45**, e91-e100.
- Ashworth C.J., Hoggard N., Thomas L., Mercer J.G., Wallace J.M. & Lea R.G. (2000) Placental leptin. *Rev Reprod* **5**, 18-24.
- Attig L., Brisard D., Larcher T., Mickiewicz M., Guilloteau P., Boukthir S., Niamba C.N., Gertler A., Djiane J., Monniaux D. & Abdennebi-Najar L. (2013) Postnatal Leptin Promotes Organ Maturation and Development in IUGR Piglets. *PLoS One* **8**, e64616.
- Attig L., Gabory A. & Junien C. (2010) Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**, 284-93.
- Attig L., Solomon G., Ferezou J., Abdennebi-Najar L., Taouis M., Gertler A. & Djiane J. (2008) Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)* **32**, 1153-60.
- Bado A., Levasseur S., Attoub S., Kermorgant S., Laigneau J.P., Bortoluzzi M.N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y. & Lewin M.J. (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* **394**, 790-3.
- Baldi A., Cheli F., Pinotti L. & Pecorini C. (2008) Nutrition in mammary gland health and lactation: advances over eight Biology of Lactation in Farm Animals meetings. *J Anim Sci* **86**, 3-9.
- Ball R.K., Friis R.R., Schoenenberger C.A., Doppler W. & Groner B. (1988) Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo J* **7**, 2089-95.
- Balland E., Dam J., Langlet F., Caron E., Steculorum S., Messina A., Rasika S., Falluel-Morel A., Anouar Y., Dehouck B., Trinquet E., Jockers R., Bouret S.G. & Prevot V. (2014) Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* **19**, 293-301.
- Balland E. & Prevot V. (2014) [Tanycytes gate leptin transport into the hypothalamus]. *Med Sci (Paris)* **30**, 624-7.
- Baly C., Aioun J., Badonnel K., Lacroix M.C., Durieux D., Schlegel C., Salesse R. & Caillol M. (2007) Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res* **1129**, 130-41.
- Baranyi M., Aszodi A., Devinoy E., Fontaine M.L., Houdebine L.M. & Bosze Z. (1996) Structure of the rabbit kappa-casein encoding gene: expression of the cloned gene in the mammary gland of transgenic mice. *Gene* **174**, 27-34.
- Baratta M. (2002) Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* **8**, RA282-92.
- Baratta M., Grolli S. & Tamanini C. (2003) Effect of leptin in proliferating and differentiated HC11 mouse mammary cells. *Regul Pept* **113**, 101-7.

- Barker D.J. (2004) The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* **23**, 588S-95S.
- Bartha T., Sayed-Ahmed A. & Rudas P. (2005) Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. *Domest Anim Endocrinol* **29**, 193-202.
- Baumann H., Morella K.K., White D.W., Dembski M., Bailon P.S., Kim H., Lai C.F. & Tartaglia L.A. (1996) The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8374-8.
- Bautista C.J., Rodriguez-Gonzalez G.L., Torres N., Hernandez-Pando R., Ramirez V., Rodriguez-Cruz M., Nathanielsz P.W. & Zambrano E. (2013) Protein restriction in the rat negatively impacts long-chain polyunsaturated fatty acid composition and mammary gland development at the end of gestation. *Arch Med Res* **44**, 429-36.
- Bazan J.F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6934-8.
- Beinder L., Faehrmann N., Wachtveitl R., Winterfeld I., Hartner A., Menendez-Castro C., Rauh M., Ruebner M., Huebner H., Noegel S.C., Doerr H.G., Rascher W. & Fahlbusch F.B. (2014) Detection of Expressional Changes Induced by Intrauterine Growth Restriction in the Developing Rat Mammary Gland via Exploratory Pathways Analysis. *PLoS One* **9**, e100504.
- Bellefontaine N., Chachlaki K., Parkash J., Vanacker C., Colledge W., d'Anglemont de Tassigny X., Garthwaite J., Bouret S.G. & Prevot V. (2014) Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Invest* **124**, 2550-9.
- Belouzard S. & Rouille Y. (2006) Ubiquitylation of leptin receptor OB-Ra regulates its clathrin-mediated endocytosis. *Embo J* **25**, 932-42.
- Beltrand J., Sloboda D.M., Connor K.L., Truong M. & Vickers M.H. (2012) The Effect of Neonatal Leptin Antagonism in Male Rat Offspring Is Dependent upon the Interaction between Prior Maternal Nutritional Status and Post-Weaning Diet. *J Nutr Metab* **2012**, 296935.
- Bergfeld E.G., Kojima F.N., Cupp A.S., Wehrman M.E., Peters K.E., Garcia-Winder M. & Kinder J.E. (1994) Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. *Biol Reprod* **51**, 1051-7.
- Bjorbaek C., Uotani S., da Silva B. & Flier J.S. (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* **272**, 32686-95.
- Bonnet M., Delavaud C., Laud K., Gourdou I., Leroux C., Djiane J. & Chilliard Y. (2002a) Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod Nutr Dev* **42**, 399-413.
- Bonnet M., Gourdou I., Leroux C., Chilliard Y. & Djiane J. (2002b) Leptin expression in the ovine mammary gland: putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci* **80**, 723-8.
- Bornstein S.R., Uhlmann K., Haidan A., Ehrhart-Bornstein M. & Scherbaum W.A. (1997) Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* **46**, 1235-8.
- Boulanger C.A., Bruno R.D., Mack D.L., Gonzales M., Castro N.P., Salomon D.S. & Smith G.H. (2013) Embryonic stem cells are redirected to non-tumorigenic epithelial cell fate by interaction with the mammary microenvironment. *PLoS One* **8**, e62019.
- Bouret S.G. (2010) Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Res* **1350**, 2-9.
- Bray G.A. & York D.A. (1979) Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* **59**, 719-809.
- Brayton C., Justice M. & Montgomery C.A. (2001) Evaluating mutant mice: anatomic pathology. *Vet Pathol* **38**, 1-19.
- Brennan A.J., Sharp J.A., Lefevre C.M. & Nicholas K.R. (2008) Uncoupling the mechanisms that facilitate cell survival in hormone-deprived bovine mammary explants. *J Mol Endocrinol* **41**, 103-16.
- Brill B., Boecher N., Groner B. & Shemanko C.S. (2008) A sparing procedure to clear the mouse mammary fat pad of epithelial components for transplantation analysis. *Lab Anim* **42**, 104-10.

- Briscoe C.P., Hanif S., Arch J.R. & Tadayyon M. (2001) Leptin receptor long-form signalling in a human liver cell line. *Cytokine* **14**, 225-9.
- Briskin C. & O'Malley B. (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003178.
- Briskin C., Park S., Vass T., Lydon J.P., O'Malley B.W. & Weinberg R.A. (1998) A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5076-81.
- Bruno R.D., Boulanger C.A., Rosenfield S.M., Anderson L.H., Lydon J.P. & Smith G.H. (2014) Paracrine-rescued lobulogenesis in chimeric outgrowths comprising progesterone-receptor-null mammary epithelium and redirected wild-type testicular cells. *J Cell Sci* **127**, 27-32.
- Buettner R., Scholmerich J. & Bollheimer L.C. (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 798-808.
- Calligaris S.D., Lecanda M., Solis F., Ezquer M., Gutierrez J., Brandan E., Leiva A., Sobrevia L. & Conget P. (2013) Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* **8**, e60931.
- Calvert D.T., Knight C.H. & Peaker M. (1985) Milk accumulation and secretion in the rabbit. *Q J Exp Physiol* **70**, 357-63.
- Capuco A.V., Smith J.J., Waldo D.R. & Rexroad C.E., Jr. (1995) Influence of prepubertal dietary regimen on mammary growth of Holstein heifers. *J Dairy Sci* **78**, 2709-25.
- Carneiro M., Rubin C.J., Di Palma F., Albert F.W., Alfoldi J., Barrio A.M., Pielberg G., Rafati N., Sayyab S., Turner-Maier J., Younis S., Afonso S., Aken B., Alves J.M., Barrell D., Bolet G., Boucher S., Burbano H.A., Campos R., Chang J.L., Duranthon V., Fontanesi L., Garreau H., Heiman D., Johnson J., Mage R.G., Peng Z., Queney G., Rogel-Gaillard C., Ruffier M., Searle S., Villafuerte R., Xiong A., Young S., Forsberg-Nilsson K., Good J.M., Lander E.S., Ferrand N., Lindblad-Toh K. & Andersson L. (2014) Rabbit genome analysis reveals a polygenic basis for phenotypic change during domestication. *Science* **345**, 1074-9.
- Caro J.F., Kolaczynski J.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Opentanova I., Goldman W.H., Lynn R.B., Zhang P.L., Sinha M.K. & Considine R.V. (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* **348**, 159-61.
- Carre N., Solomon G., Gertler A. & Binart N. (2014) Effects of high affinity leptin antagonist on prolactin receptor deficient male mouse. *PLoS One* **9**, e91422.
- Carrington C.A., Hosick H.L., Forsyth I.A. & Dils R.R. (1981) Novel multialveolar epithelial structures from rabbit mammary gland that synthesize milk specific fatty acids in response to prolactin. *In Vitro* **17**, 363-8.
- Casabiell X., Pineiro V., Tome M.A., Peino R., Dieguez C. & Casanueva F.F. (1997) Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4270-3.
- Challis J.R., Davies J. & Ryan K.J. (1973) The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 beta in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology* **93**, 971-6.
- Chapman D.J. & Perez-Escamilla R. (1999) Identification of risk factors for delayed onset of lactation. *J Am Diet Assoc* **99**, 450-4; quiz 5-6.
- Cohen B., Novick D. & Rubinstein M. (1996) Modulation of insulin activities by leptin. *Science* **274**, 1185-8.
- Connor K.L., Vickers M.H., Beltrand J., Meaney M.J. & Sloboda D.M. (2012) Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *J Physiol* **590**, 2167-80.
- Couturier C. & Jockers R. (2003) Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J Biol Chem* **278**, 26604-11.
- Couvreux O., Ferezou J., Grippo D., Serougne C., Crepin D., Aubourg A., Gertler A., Vacher C.M. & Taouis M. (2011) Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One* **6**, e18043.

- Daniel C.W., Deome K.B., Young J.T., Blair P.B. & Faulkin L.J., Jr. (2009) The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. 1968. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **14**, 355-62.
- Davis Rincker L.E., Weber Nielsen M.S., Chapin L.T., Liesman J.S. & VandeHaar M.J. (2008) Effects of feeding prepubertal heifers a high-energy diet for three, six, or twelve weeks on feed intake, body growth, and fat deposition. *J Dairy Sci* **91**, 1913-25.
- Dawson R., Pelleymounter M.A., Millard W.J., Liu S. & Eppler B. (1997) Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol* **273**, E202-6.
- Debnath J., Muthuswamy S.K. & Brugge J.S. (2003) Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**, 256-68.
- Dehnhard M., Claus R., Munz O. & Weiler U. (2000) Course of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I (IGF-I) in mammary secretions of the goat during end-pregnancy and early lactation. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **47**, 533-40.
- Delahaye F., Breton C., Risold P.Y., Enache M., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., Lesage J. & Vieau D. (2008) Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* **149**, 470-5.
- Delouis , Houdebine L.M. & P. R. (2001) La lactation. . *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme.*, 580-610.
- Denamur R. (1963a) Mammary growth and lactogenesis induced by prolactin in the pregnant rabbit. *C R Hebd Seances Acad Sci* **257**, 1548-51.
- Denamur R. (1963b) Nucleic acids of the mammary gland during gestation and lactation in the rabbit. *C R Hebd Seances Acad Sci* **256**, 4748-50.
- Deome K.B., Faulkin L.J., Jr., Bern H.A. & Blair P.B. (1959) Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* **19**, 515-20.
- Devaskar S.U., Ollesch C., Rajakumar R.A. & Rajakumar P.A. (1997) Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 44-7.
- Devinoy E. & Houdebine L.M. (1977) Effects of glucocorticoids on casein gene expression in the rabbit. *Eur J Biochem* **75**, 411-6.
- Diamanti-Kandarakis E. & Kandarakis H.A. (2004) Obesity and gonadal function of women. *Pediatr Endocrinol Rev* **1 Suppl 3**, 465-70.
- Dieudonne M.N., Machinal-Quelin F., Serazin-Leroy V., Leneuve M.C., Pecquery R. & Giudicelli Y. (2002) Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 622-8.
- Doppler W., Hock W., Hofer P., Groner B. & Ball R.K. (1990) Prolactin and glucocorticoid hormones control transcription of the beta-casein gene by kinetically distinct mechanisms. *Mol Endocrinol* **4**, 912-9.
- Doyon C D.G., Trudeau VL, Moon TW. (2001) Molecular evolution of leptin. *Gen Comp Endocrinol.* **124**, 188-98.
- Dunn S.L., Bjornholm M., Bates S.H., Chen Z., Seifert M. & Myers M.G., Jr. (2005) Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol Endocrinol* **19**, 925-38.
- Eilers E., Ziska T., Harder T., Plagemann A., Obladen M. & Loui A. (2011) Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants. *Early Hum Dev* **87**, 415-9.
- Eirew P., Stingl J., Raouf A., Turashvili G., Aparicio S., Emerman J.T. & Eaves C.J. (2008) A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nat Med* **14**, 1384-9.

- Elias C.F. & Purohit D. (2013) Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell Mol Life Sci* **70**, 841-62.
- Enami J. & Nandi S. (1977) Hormonal control of milk protein synthesis in cultured mouse mammary explants. *Cell Differ* **6**, 217-27.
- Estienne M.J., Harper A.F., Barb C.R. & Azain M.J. (2000) Concentrations of leptin in serum and milk collected from lactating sows differing in body condition. *Domest Anim Endocrinol* **19**, 275-80.
- Ewart-Toland A., Mounzih K., Qiu J. & Chehab F.F. (1999) Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. *Endocrinology* **140**, 732-8.
- Farmer C., Petitclerc D., Sorensen M.T., Vignola M. & Dourmad J.Y. (2004) Impacts of dietary protein level and feed restriction during prepuberty on mammary development in gilts. *J Anim Sci* **82**, 2343-51.
- Fernandez-Twinn D.S., Ekizoglou S., Martin-Gronert M.S., Tarry-Adkins J., Wayman A.P., Warner M.J., Luan J.A., Gusterson B.A. & Ozanne S.E. (2010) Poor early growth and excessive adult calorie intake independently and additively affect mitogenic signaling and increase mammary tumor susceptibility. *Carcinogenesis* **31**, 1873-81.
- Feuermann Y S.A., Mabeesh SJ. (2008) Leptin up-regulates the lactogenic effect of prolactin in the bovine mammary gland *in vitro*. *J Dairy Sci*. **91**, 4183-9.
- Flier J.S. (1998) Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1407-13.
- Flint D.J., Travers M.T., Barber M.C., Binart N. & Kelly P.A. (2005) Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E1179-87.
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Fong T.M., Huang R.R., Tota M.R., Mao C., Smith T., Varnerin J., Karpitskiy V.V., Krause J.E. & Van der Ploeg L.H. (1998) Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol* **53**, 234-40.
- Fortun-Lamothe L. (2006) Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim Reprod Sci* **93**, 1-15.
- Fruebis J., Tsao T.S., Javorschi S., Ebbets-Reed D., Erickson M.R., Yen F.T., Bihain B.E. & Lodish H.F. (2001) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2005-10.
- Fruhbeck G., Aguado M. & Martinez J.A. (1997) In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 590-4.
- Gaillard R.C., Spinedi E., Chautard T. & Pralong F.P. (2000) Cytokines, leptin, and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Ann N Y Acad Sci* **917**, 647-57.
- Gainsford T., Willson T.A., Metcalf D., Handman E., McFarlane C., Ng A., Nicola N.A., Alexander W.S. & Hilton D.J. (1996) Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14564-8.
- Galio L., Droineau S., Yeboah P., Boudiaf H., Bouet S., Truchet S. & Devinoy E. (2012) microRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205 and miR-200. *Physiol Genomics*.
- Garcia M.D., Casanueva F.F., Dieguez C. & Senaris R.M. (2000) Gestational profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation. *Biol Reprod* **62**, 698-703.
- German T. & Barash I. (2002) Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**, 282-92.

- Ghilardi N., Ziegler S., Wiestner A., Stoffel R., Heim M.H. & Skoda R.C. (1996) Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6231-5.
- Ginsburg E. & Vonderhaar B.K. (1995) Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res* **55**, 2591-5.
- Gonzalez L.C., Pinilla L., Tena-Sempere M. & Aguilar E. (1999) Leptin(116-130) stimulates prolactin and luteinizing hormone secretion in fasted adult male rats. *Neuroendocrinology* **70**, 213-20.
- Gonzalez R.R. & Leavis P.C. (2003) A peptide derived from the human leptin molecule is a potent inhibitor of the leptin receptor function in rabbit endometrial cells. *Endocrine* **21**, 185-95.
- Goodwill M.G., Jessop N.S. & Oldham J.D. (1996) Mammary sensitivity to protein restriction and re-alimentation. *Br J Nutr* **76**, 423-34.
- Gors S., Kucia M., Langhammer M., Junghans P. & Metges C.C. (2009) Technical note: Milk composition in mice--methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. *J Dairy Sci* **92**, 632-7.
- Gorska E., Popko K., Stelmazczyk-Emmel A., Ciepiela O., Kucharska A. & Wasik M. (2010) Leptin receptors. *Eur J Med Res* **15 Suppl 2**, 50-4.
- Gorski J.N., Dunn-Meynell A.A., Hartman T.G. & Levin B.E. (2006) Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R768-78.
- Grabowski H., Le Bars D., Chene N., Attal J., Malienou-Ngassa R., Puissant C. & Houdebine L.M. (1991) Rabbit whey acidic protein concentration in milk, serum, mammary gland extract, and culture medium. *J Dairy Sci* **74**, 4143-50.
- Grattan D.R., Ladyman S.R. & Augustine R.A. (2007) Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. *Physiol Behav* **91**, 366-74.
- Graur D., Duret L. & Gouy M. (1996) Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* **379**, 333-5.
- Gugusheff J.R., Vithayathil M., Ong Z.Y. & Muhlhausler B.S. (2013) The effects of prenatal exposure to a 'junk food' diet on offspring food preferences and fat deposition can be mitigated by improved nutrition during lactation. *J Dev Orig Health Dis* **4**, 348-57.
- Guo F. & Jen K.L. (1995) High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* **57**, 681-6.
- Haeuptle M.T., Suard Y.L., Bogenmann E., Reggio H., Racine L. & Kraehenbuhl J.P. (1983) Effect of cell shape change on the function and differentiation of rabbit mammary cells in culture. *J Cell Biol* **96**, 1425-34.
- Haluzik M., Colombo C., Gavrilova O., Chua S., Wolf N., Chen M., Stannard B., Dietz K.R., Le Roith D. & Reitman M.L. (2004) Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology* **145**, 3258-64.
- Harris R.B. & Martin R.J. (1989) Changes in lipogenesis and lipolysis associated with recovery from reversible obesity in mature female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **191**, 82-9.
- Haslam S.Z. (1988) Acquisition of estrogen-dependent progesterone receptors by normal mouse mammary gland. Ontogeny of mammary progesterone receptors. *J Steroid Biochem* **31**, 9-13.
- Hassink S.G., de Lancey E., Sheslow D.V., Smith-Kirwin S.M., O'Connor D.M., Considine R.V., Opentanova I., Dostal K., Spear M.L., Leef K., Ash M., Spitzer A.R. & Funanage V.L. (1997) Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* **100**, E1.
- Head H.H., Delouis C., Terqui M., Kann G. & Djiane J. (1980) Effects of various hormone treatments on induction of lactation in the ewe. *J Anim Sci* **50**, 706-12.
- Heiman M.L., Ahima R.S., Craft L.S., Schoner B., Stephens T.W. & Flier J.S. (1997) Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* **138**, 3859-63.
- Helfenstein T., Fonseca F.A., Ihara S.S., Bottos J.M., Moreira F.T., Pott H., Jr., Farah M.E., Martins M.C. & Izar M.C. (2011) Impaired glucose tolerance plus hyperlipidaemia induced by diet promotes retina microaneurysms in New Zealand rabbits. *Int J Exp Pathol* **92**, 40-9.

- Helman D., Herman A., Paly J., Livnah O., Elkins P.A., de Vos A.M., Djiane J. & Gertler A. (2001) Mutations of ovine and bovine placental lactogens change, in different ways, the biological activity mediated through homologous and heterologous lactogenic receptors. *J Endocrinol* **169**, 43-54.
- Hennighausen L. & Robinson G.W. (2005) Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 715-25.
- Higa T.S., Spinola A.V., Fonseca-Alaniz M.H. & Evangelista F.S. (2014) Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **6**, 47-54.
- Hilakivi-Clarke L. (2007) Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr Cancer Drug Targets* **7**, 465-74.
- Hilakivi-Clarke L., Clarke R., Onojafe I., Raygada M., Cho E. & Lippman M. (1997) A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9372-7.
- Hill J.O., Dorton J., Sykes M.N. & Digirolamo M. (1989) Reversal of dietary obesity is influenced by its duration and severity. *Int J Obes* **13**, 711-22.
- Hobbs A.A., Richards D.A., Kessler D.J. & Rosen J.M. (1982) Complex hormonal regulation of rat casein gene expression. *J Biol Chem* **257**, 3598-605.
- Hoggard N., Haggarty P., Thomas L. & Lea R.G. (2001) Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem Soc Trans* **29**, 57-63.
- Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P. & Mercer J.G. (1997) Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11073-8.
- Holemans K., Gerber R., Meurrens K., De Clerck F., Poston L. & Van Assche F.A. (1999) Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr* **81**, 73-9.
- Houseknecht K.L., McGuire M.K., Portocarrero C.P., McGuire M.A. & Beerman K. (1997) Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 742-7.
- Hovey R.C., McFadden T.B. & Akers R.M. (1999) Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **4**, 53-68.
- Hovey R.C., Trott J.F. & Vonderhaar B.K. (2002) Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 17-38.
- Howard J.K., Cave B.J., Oksanen L.J., Tzamelis I., Bjorbaek C. & Flier J.S. (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* **10**, 734-8.
- Howie G.J., Sloboda D.M., Kamal T. & Vickers M.H. (2009) Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* **587**, 905-15.
- Howie G.J., Sloboda D.M., Reynolds C.M. & Vickers M.H. (2013) Timing of maternal exposure to a high fat diet and development of obesity and hyperinsulinemia in male rat offspring: same metabolic phenotype, different developmental pathways? *J Nutr Metab* **2013**, 517384.
- Howie G.J., Sloboda D.M. & Vickers M.H. (2012) Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br J Nutr* **108**, 298-307.
- Howlett A.R. & Bissell M.J. (1993) The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epithelial Cell Biol* **2**, 79-89.
- Hu X., Juneja S.C., Maihle N.J. & Cleary M.P. (2002) Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst* **94**, 1704-11.

- Huan J.N., Li J., Han Y., Chen K., Wu N. & Zhao A.Z. (2003) Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J Biol Chem* **278**, 45638-50.
- Hue-Beauvais C., Chavatte-Palmer P., Aujean E., Dahirel M., Laigre P., Pechoux C., Bouet S., Devinoy E. & Charlier M. (2011) An obesogenic diet started before puberty leads to abnormal mammary gland development during pregnancy in the rabbit. *Dev Dyn* **240**, 347-56.
- Hvid H., Thorup I., Sjogren I., Oleksiewicz M.B. & Jensen H.E. (2012) Mammary gland proliferation in female rats: effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. *Exp Toxicol Pathol* **64**, 321-32.
- Ibarra I., Erlich Y., Muthuswamy S.K., Sachidanandam R. & Hannon G.J. (2007) A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev* **21**, 3238-43.
- Ilan N., Barash I., Gootwine E. & Shani M. (1998) Establishment and initial characterization of the ovine mammary epithelial cell line NISH. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **34**, 326-32.
- Ilcol Y.O., Hizli Z.B. & Ozkan T. (2006) Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status. *Int Breastfeed J* **1**, 21.
- Ip M.M. & Darcy K.M. (1996) Three-dimensional mammary primary culture model systems. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **1**, 91-110.
- Jaquet D., Leger J., Levy-Marchal C., Oury J.F. & Czernichow P. (1998) Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1243-6.
- Jolivet G., Pantano T. & Houdebine L.M. (2005) Regulation by the extracellular matrix (ECM) of prolactin-induced alpha s1-casein gene expression in rabbit primary mammary cells: role of STAT5, C/EBP, and chromatin structure. *J Cell Biochem* **95**, 313-27.
- Kamikawa A., Ichii O., Yamaji D., Imao T., Suzuki C., Okamatsu-Ogura Y., Terao A., Kon Y. & Kimura K. (2009) Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Dev Dyn* **238**, 1092-9.
- Karmiris K., Koutroubakis I.E. & Kouroumalis E.A. (2008) Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin--implications for inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* **52**, 855-66.
- Kelly PA B.A., Kedzia C, Hennighausen L, Ormandy CJ, Kopchick JJ, Binart N (2002) The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol*. **197**, 127-31.
- Khan I.Y., Dekou V., Douglas G., Jensen R., Hanson M.A., Poston L. & Taylor P.D. (2005) A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R127-33.
- Kielar D., Clark J.S., Ciechanowicz A., Kurzawski G., Sulikowski T. & Naruszewicz M. (1998) Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism* **47**, 844-7.
- Kirk S.L., Samuelsson A.M., Argenton M., Dhonye H., Kalamatianos T., Poston L., Taylor P.D. & Coen C.W. (2009) Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One* **4**, e5870.
- Koch E., Hue-Beauvais C., Galio L., Solomon G., Gertler A., Revillon F., Lhotellier V., Aujean E., Devinoy E. & Charlier M. (2013) Leptin gene in rabbit: cloning and expression in mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *Physiol Genomics*.
- Kohno D. & Yada T. (2012) Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides* **46**, 315-9.
- Koletzko B., Brands B., Poston L., Godfrey K. & Demmelmair H. (2012) Early nutrition programming of long-term health. *Proc Nutr Soc* **71**, 371-8.
- Kouba M. & Mourot J. (2011) A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* **93**, 13-7.
- Langer P. (2008) The phases of maternal investment in eutherian mammals. *Zoology (Jena)* **111**, 148-62.

- Langley-Evans S.C., Nwagwu, M. (1998) Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sci* **63**, 605-15.
- Laud K., Gourdou I., Bélair L., Keisler D.H. & Djiane J. (1999) Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS Lett* **463**, 194-8.
- Laud K., Gourdou I., Pessemesse L., Peyrat J.P. & Djiane J. (2002) Identification of leptin receptors in human breast cancer: functional activity in the T47-D breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol* **188**, 219-26.
- Lee M.J., Wang Y., Ricci M.R., Sullivan S., Russell C.D. & Fried S.K. (2007) Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E858-64.
- Lee S., Lee K.A., Choi G.Y., Desai M., Lee S.H., Pang M.G., Jo I. & Kim Y.J. (2013) Feed restriction during pregnancy/lactation induces programmed changes in lipid, adiponectin and leptin levels with gender differences in rat offspring. *J Matern Fetal Neonatal Med* **26**, 908-14.
- Leroy P., Dessolin S., Villageois P., Moon B.C., Friedman J.M., Ailhaud G. & Dani C. (1996) Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* **271**, 2365-8.
- Levine J.F. & Stockdale F.E. (1984) 3T3-L1 adipocytes promote the growth of mammary epithelium. *Exp Cell Res* **151**, 112-22.
- Lin Y L.Q. (2007) Expression and function of leptin and its receptor in mouse mammary gland. *Sci china c life sci* **50**, 669-75.
- Llado I., Proenza A.M., Serra F., Palou A. & Pons A. (1991) Dietary-induced permanent changes in brown and white adipose tissue composition in rats. *Int J Obes* **15**, 415-9.
- Lollivier V., Marnet P.G., Delpal S., Rainteau D., Achard C., Rabot A. & Ollivier-Bousquet M. (2006) Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. *J Physiol* **570**, 125-40.
- Lu M.H. & Anderson R.R. (1973) Growth of the mammary gland during pregnancy and lactation in the rabbit. *Biol Reprod* **9**, 538-43.
- Lucas A. (1991) Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* **156**, 38-50; discussion -5.
- Luo C., Zuniga J., Edison E., Palla S., Dong W. & Parker-Thornburg J. (2011) Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **50**, 471-8.
- Macias H. & Hinck L. (2012) Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**, 533-57.
- Maertens I.F., sz szendro (2006) Rabbit Milk : A review of quantity, quality and non-dietary affecting factor. *World Rabbit Sciences* **14**, 205-30.
- Malik N.M., Carter N.D., Murray J.F., Scaramuzzi R.J., Wilson C.A. & Stock M.J. (2001) Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. *Endocrinology* **142**, 5198-202.
- Manalu W., Sumaryadi M.Y., Sudjatmogo & Satyaningtijas A.S. (2000) Effect of superovulation prior to mating on milk production performance during lactation in ewes. *J Dairy Sci* **83**, 477-83.
- Mancour Liliya V., Daghestani Hikmat N., Dutta S., Westfield Gerwin H., Schilling J., Oleskie Austin N., Herbstman Jeffrey F., Chou Steven Z. & Skiniotis G. (2012) Ligand-Induced Architecture of the Leptin Receptor Signaling Complex. *Molecular Cell* **48**, 655-61.
- Mandel M.A. & Mahmoud A.A. (1978) Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db). *J Immunol* **120**, 1375-7.
- Masuyama H. & Hiramatsu Y. (2014) Additive Effects of Maternal High Fat Diet during Lactation on Mouse Offspring. *PLoS One* **9**, e92805.
- Masuzaki H., Ogawa Y., Hosoda K., Miyawaki T., Hanaoka I., Hiraoka J., Yasuno A., Nishimura H., Yoshimasa Y., Nishi S. & Nakao K. (1997) Glucocorticoid regulation of leptin synthesis and secretion in humans: elevated plasma leptin levels in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2542-7.
- Mather I.H. & Keenan T.W. (1998) The cell biology of milk secretion: historical notes. Introduction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 227-32.

- McClellan H.L., Miller S.J. & Hartmann P.E. (2008) Evolution of lactation: nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. *Nutr Res Rev* **21**, 97-116.
- Medina D., Oborn C.J., Kittrell F.S. & Ullrich R.L. (1986) Properties of mouse mammary epithelial cell lines characterized by in vivo transplantation and in vitro immunocytochemical methods. *J Natl Cancer Inst* **76**, 1143-56.
- Mercer J.G., Hoggard N., Williams L.M., Lawrence C.B., Hannah L.T. & Trayhurn P. (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* **387**, 113-6.
- Morale S.E., Hoffman D.R., Castaneda Y.S., Wheaton D.H., Burns R.A. & Birch E.E. (2005) Duration of long-chain polyunsaturated fatty acids availability in the diet and visual acuity. *Early Hum Dev* **81**, 197-203.
- Mori T., Nagasawa H. & Bern H.A. (1979) Long-term effects of perinatal exposure to hormones on normal and neoplastic mammary growth in rodents: a review. *J Environ Pathol Toxicol* **3**, 191-205.
- Morrison W.R. & Smith L.M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *J Lipid Res* **5**, 600-8.
- Morton N.M., Emilsson V., Liu Y.L. & Cawthorne M.A. (1998) Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* **273**, 26194-201.
- Mostyn A., Keisler D.H., Webb R., Stephenson T. & Symonds M.E. (2001) The role of leptin in the transition from fetus to neonate. *Proc Nutr Soc* **60**, 187-94.
- Motta A.P., Baratta M. (2004) Leptin and prolactin modulate the expression of SOCS-1 in association with interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in mammary cells: a role in differentiated secretory epithelium. *Regul Pept.* **121**, 163-70.
- Mounzih K., Qiu J., Ewart-Toland A. & Chehab F.F. (1998) Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* **139**, 5259-62.
- Mroue R. & Bissell M.J. (2013) Three-dimensional cultures of mouse mammary epithelial cells. *Methods Mol Biol* **945**, 221-50.
- Mulac-Jericevic B., Lydon J.P., DeMayo F.J. & Conneely O.M. (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9744-9.
- Munzberg H., Bjornholm M., Bates S.H. & Myers M.G., Jr. (2005) Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* **62**, 642-52.
- Myers M.G., Cowley M.A. & Munzberg H. (2008) Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* **70**, 537-56.
- Naylor M.J. & Ormandy C.J. (2002) Mouse strain-specific patterns of mammary epithelial ductal side branching are elicited by stromal factors. *Dev Dyn* **225**, 100-5.
- Nejati-Koshki K., Zarghami N., Pourhassan-Moghaddam M., Rahmati-Yamchi M., Mollazade M., Nasiri M., Esfahlan R.J., Barkhordari A. & Tayefi-Nasrabadi H. (2012) Inhibition of leptin gene expression and secretion by silibinin: possible role of estrogen receptors. *Cytotechnology* **64**, 719-26.
- Neville M.C., Medina D., Monks J. & Hovey R.C. (1998) The mammary fat pad. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 109-16.
- Niculescu M.D. & Lupu D.S. (2009) High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* **27**, 627-33.
- Niswender K.D. & Schwartz M.W. (2003) Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* **24**, 1-10.
- Oddy W.H., Li J., Landsborough L., Kendall G.E., Henderson S. & Downie J. (2006) The association of maternal overweight and obesity with breastfeeding duration. *J Pediatr* **149**, 185-91.
- Olivo S.E. & Hilakivi-Clarke L. (2005) Opposing effects of prepubertal low- and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on rat mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis* **26**, 1563-72.

- Olson L.K., Tan Y., Zhao Y., Aupperlee M.D. & Haslam S.Z. (2010) Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness. *Int J Obes (Lond)* **34**, 1415-26.
- Ormandy CJ C.A., Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA. (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* **11**, 167-78.
- Parks B.W., Nam E., Org E., Kostem E., Norheim F., Hui S.T., Pan C., Civelek M., Rau C.D., Bennett B.J., Mehrabian M., Ursell L.K., He A., Castellani L.W., Zinker B., Kirby M., Drake T.A., Drevon C.A., Knight R., Gargalovic P., Kirchgessner T., Eskin E. & Lusis A.J. (2013) Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab* **17**, 141-52.
- Parry G., Cullen B., Kaetzel C.S., Kramer R. & Moss L. (1987) Regulation of differentiation and polarized secretion in mammary epithelial cells maintained in culture: extracellular matrix and membrane polarity influences. *J Cell Biol* **105**, 2043-51.
- Pauley R.J., Soule H.D., Tait L., Miller F.R., Wolman S.R., Dawson P.J. & Heppner G.H. (1993) The MCF10 family of spontaneously immortalized human breast epithelial cell lines: models of neoplastic progression. *Eur J Cancer Prev* **2 Suppl 3**, 67-76.
- Pico C., Sanchez J., Oliver P., Miralles O., Ceresi E. & Palou A. (2007) Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the post-natal period. *Genes Nutr* **2**, 139-41.
- Picone O., Laigre P., Fortun-Lamothe L., Archilla C., Peynot N., Ponter A.A., Berthelot V., Cordier A.G., Duranthon V. & Chavatte-Palmer P. (2011) Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology* **75**, 287-99.
- Pinotti L. & Rosi F. (2006) Leptin in bovine colostrum and milk. *Horm Metab Res* **38**, 89-93.
- Plagemann A., Harder T., Rake A., Voits M., Fink H., Rohde W. & Dorner G. (1999) Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res* **836**, 146-55.
- Priego T., Sanchez J., Palou A. & Pico C. (2010) Leptin intake during the suckling period improves the metabolic response of adipose tissue to a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* **34**, 809-19.
- Prior L.J., Eikelis N., Armitage J.A., Davern P.J., Burke S.L., Montani J.P., Barzel B. & Head G.A. (2010) Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension* **55**, 862-8.
- Procaccini C., Jirillo E. & Matarese G. (2012) Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med* **33**, 35-45.
- Proulx K., Richard D. & Walker C.D. (2002) Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* **143**, 4683-92.
- Puissant C. & Houdebine L.M. (1991) Cortisol induces rapid accumulation of whey acid protein mRNA but not of asl and b-casein mRNA in rabbit mammary explants. *Cell Biol Int Rep* **15**, 121-9.
- Pullan S., Wilson J., Metcalfe A., Edwards G.M., Goberdhan N., Tilly J., Hickman J.A., Dive C. & Streuli C.H. (1996) Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci* **109 (Pt 3)**, 631-42.
- Purup S., Vestergaard M. & Sejrsen K. (2000) Involvement of growth factors in the regulation of pubertal mammary growth in cattle. *Adv Exp Med Biol* **480**, 27-43.
- Rajala M.W., Patterson C.M., Opp J.S., Foltin S.K., Young V.B. & Myers M.G., Jr. (2014) Leptin acts independently of food intake to modulate gut microbial composition in male mice. *Endocrinology* **155**, 748-57.
- Rasmussen K.M., Hilson J.A. & Kjolhede C.L. (2001) Obesity may impair lactogenesis II. *J Nutr* **131**, 3009S-11S.
- Rasmussen K.M. & Kjolhede C.L. (2004) Prepregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics* **113**, e465-71.

- Reed M.G., Howard C.V. & GS D.E.Y. (2010) One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers. *J Microsc* **239**, 54-65.
- Renaville R., Van Eenaeme C., Breier B.H., Vleurick L., Bertozzi C., Gengler N., Hornick J.L., Parmentier I., Istasse L., Haezebroeck V., Massart S. & Portetelle D. (2000) Feed restriction in young bulls alters the onset of puberty in relationship with plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins. *Domest Anim Endocrinol* **18**, 165-76.
- Rolls B.A., Gurr M.I., van Duijvenvoorde P.M., Rolls B.J. & Rowe E.A. (1986) Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. *Physiol Behav* **38**, 185-90.
- Rolls B.J., Rowe E.A. & Turner R.C. (1980) Persistent obesity in rats following a period of consumption of a mixed, high energy diet. *J Physiol* **298**, 415-27.
- Rolls B.J., van Duijvenvoorde P.M. & Rowe E.A. (1984) Effects of diet and obesity on body weight regulation during pregnancy and lactation in the rat. *Physiol Behav* **32**, 161-8.
- Ronti T., Lupattelli G. & Mannarino E. (2006) The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**, 355-65.
- Rosso P., Keyou G., Bassi J.A. & Slusser W.M. (1981) Effect of malnutrition during pregnancy on the development of the mammary glands of rats. *J Nutr* **111**, 1937-41.
- Rousseau D., Helies-Toussaint C., Moreau D., Raederstorff D. & Grynberg A. (2003) Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1294-302.
- Rudland P.S., Twiston Davies A.C. & Tsao S.W. (1984) Rat mammary preadipocytes in culture produce a trophic agent for mammary epithelia-prostaglandin E2. *J Cell Physiol* **120**, 364-76.
- Saben J.L., Bales E.S., Jackman M.R., Orlicky D., MacLean P.S. & McManaman J.L. (2014) Maternal obesity reduces milk lipid production in lactating mice by inhibiting acetyl-CoA carboxylase and impairing fatty acid synthesis. *PLoS One* **9**, e98066.
- Sampey B.P., Vanhoose A.M., Winfield H.M., Freemerman A.J., Muehlbauer M.J., Fueger P.T., Newgard C.B. & Makowski L. (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* **19**, 1109-17.
- Samuelsson A.M., Matthews P.A., Argenton M., Christie M.R., McConnell J.M., Jansen E.H., Piersma A.H., Ozanne S.E., Twinn D.F., Remacle C., Rowlerson A., Poston L. & Taylor P.D. (2008) Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* **51**, 383-92.
- Sanchez J., Oliver P., Miralles O., Ceresi E., Pico C. & Palou A. (2005) Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* **146**, 2575-82.
- Satoh N., Ogawa Y., Katsuura G., Hayase M., Tsuji T., Imagawa K., Yoshimasa Y., Nishi S., Hosoda K. & Nakao K. (1997) The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett* **224**, 149-52.
- Savino F., Benetti S., Liguori S.A., Sorrenti M. & Cordero Di Montezemolo L. (2013) Advances on human milk hormones and protection against obesity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **59**, 89-98.
- Sayed-Ahmed A., Kulcsár M., Rudas P. & Bartha T. (2004) Expression and localisation of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow. *Acta Vet Hung* **52**, 97-111.
- Schubring C., Kiess W., Englaro P., Rascher W., Dotsch J., Hanitsch S., Attanasio A. & Blum W.F. (1997) Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1480-3.
- Schulz L.C. & Roberts R.M. (2011) Dynamic changes in leptin distribution in the progression from ovum to blastocyst of the pre-implantation mouse embryo. *Reproduction* **141**, 767-77.

- Sejrsen K. (1994) Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle. *Proc Nutr Soc* **53**, 103-11.
- Sejrsen K. & Purup S. (1997) Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *J Anim Sci* **75**, 828-35.
- Sejrsen K., Purup S., Vestergaard M. & Foldager J. (2000) High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. *Domest Anim Endocrinol* **19**, 93-104.
- Sen S., Carpenter A.H., Hochstadt J., Huddleston J.Y., Kustanovich V., Reynolds A.A. & Roberts S. (2012) Nutrition, weight gain and eating behavior in pregnancy: a review of experimental evidence for long-term effects on the risk of obesity in offspring. *Physiol Behav* **107**, 138-45.
- Servely J.L., Emane M.N., Houdebine L.M., Djiane J., Delouis C. & Kelly P.A. (1983) Comparative measurement of the lactogenic activity of ovine placental lactogen in rabbit and ewe mammary gland. *Gen Comp Endocrinol* **51**, 255-62.
- Sheffield L.G. (1998) Hormonal regulation of epidermal growth factor receptor content and signaling in bovine mammary tissue. *Endocrinology* **139**, 4568-75.
- Siegrist-Kaiser C.A., Pauli V., Juge-Aubry C.E., Boss O., Pernin A., Chin W.W., Cusin I., Rohner-Jeanrenaud F., Burger A.G., Zapf J. & Meier C.A. (1997) Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* **100**, 2858-64.
- Silva L.F., VandeHaar M.J., Weber Nielsen M.S. & Smith G.W. (2002) Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. *J Dairy Sci* **85**, 3277-86.
- Sitaraman S., Liu X., Charrier L., Gu L.H., Ziegler T.R., Gewirtz A. & Merlin D. (2004) Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J* **18**, 696-8.
- Skaar T.C. & Baumrucker C.R. (1993) Regulation of insulin-like growth factor binding protein secretion by a murine mammary epithelial cell line. *Exp Cell Res* **209**, 183-8.
- Smith-Kirwin S.M., O'Connor D.M., De Johnston J., Lancey E.D., Hassink S.G. & Funanage V.L. (1998) Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1810-3.
- Smith G.H. & Medina D. (1988) A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci* **90 (Pt 1)**, 173-83.
- Smith J.L. & Sheffield L.G. (2002) Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol* **22**, 145-54.
- Sobhani I., Bado A., Vissuzaine C., Buyse M., Kermorgant S., Laigneau J.P., Attoub S., Lehy T., Henin D., Mignon M. & Lewin M.J. (2000) Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* **47**, 178-83.
- Speakman J.R., Levitsky D.A., Allison D.B., Bray M.S., de Castro J.M., Clegg D.J., Clapham J.C., Dulloo A.G., Gruer L., Haw S., Hebebrand J., Hetherington M.M., Higgs S., Jebb S.A., Loos R.J., Luckman S., Luke A., Mohammed-Ali V., O'Rahilly S., Pereira M., Perusse L., Robinson T.N., Rolls B., Symonds M.E. & Westerterp-Plantenga M.S. (2011) Set points, settling points and some alternative models: theoretical options to understand how genes and environments combine to regulate body adiposity. *Dis Model Mech* **4**, 733-45.
- Stettler N., Elliott M.R., Kallan M.J., Auerbach S.B. & Kumanyika S.K. (2005) High prevalence of overweight among pediatric users of community health centers. *Pediatrics* **116**, e381-8.
- Stettler N. & Stallings V.A. (2002) Adult obesity and growth in childhood. Association of birth weight with adult weight is confounded by maternal body mass index. *BMJ* **324**, 674.
- Stingl J., Eirew P., Ricketson I., Shackleton M., Vaillant F., Choi D., Li H.I. & Eaves C.J. (2006) Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**, 993-7.
- Streuli C.H. & Bissell M.J. (1990) Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J Cell Biol* **110**, 1405-15.
- Strong C.R. & Dils R. (1972) Fatty acid biosynthesis in rabbit mammary gland during pregnancy and early lactation. *Biochem J* **128**, 1303-9.
- Strong C.R., Forsyth I. & Dils R. (1972) The effects of hormones on milk-fat synthesis in mammary explants from pseudopregnant rabbits. *Biochem J* **128**, 509-19.

- Sukhotnik I., Coran A.G., Mogilner J.G., Shamian B., Karry R., Lieber M. & Shaoul R. (2009) Leptin affects intestinal epithelial cell turnover in correlation with leptin receptor expression along the villus-crypt axis after massive small bowel resection in a rat. *Pediatr Res* **66**, 648-53.
- Sun B., Purcell R.H., Terrillion C.E., Yan J., Moran T.H. & Tamashiro K.L. (2012) Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes* **61**, 2833-41.
- Sweeney G. (2002) Leptin signalling. *Cell Signal* **14**, 655-63.
- Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K.J., Smutko J.S., Mays G.G., Wool E.A., Monroe C.A. & Tepper R.I. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263-71.
- Tatemoto K. (1982) Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5485-9.
- Tsuduki T., Kitano Y., Honma T., Kijima R. & Ikeda I. (2013) High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **59**, 384-92.
- Tucker K.R., Godbey S.J., Thiebaud N. & Fadool D.A. (2012) Olfactory ability and object memory in three mouse models of varying body weight, metabolic hormones, and adiposity. *Physiol Behav* **107**, 424-32.
- Tucker L.A. & Kano M.J. (1992) Dietary fat and body fat: a multivariate study of 205 adult females. *Am J Clin Nutr* **56**, 616-22.
- Uysal F.K., Onal E.E., Aral Y.Z., Adam B., Dilmen U. & Ardicolu Y. (2002) Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity. *Clin Nutr* **21**, 157-60.
- Van Keymeulen A., Rocha A.S., Ousset M., Beck B., Bouvencourt G., Rock J., Sharma N., Dekoninck S. & Blanpain C. (2011) Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* **479**, 189-93.
- Vickers M.H., Breier B.H., Cutfield W.S., Hofman P.L. & Gluckman P.D. (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E83-7.
- Vickers M.H., Gluckman P.D., Coveny A.H., Hofman P.L., Cutfield W.S., Gertler A., Breier B.H. & Harris M. (2005) Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* **146**, 4211-6.
- Vickers M.H., Gluckman P.D., Coveny A.H., Hofman P.L., Cutfield W.S., Gertler A., Breier B.H. & Harris M. (2008) The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology* **149**, 1906-13.
- Vidi P.A., Bissell M.J. & Lelievre S.A. (2013) Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. *Methods Mol Biol* **945**, 193-219.
- Wahlig J.L., Bales E.S., Jackman M.R., Johnson G.C., McManaman J.L. & Maclean P.S. (2012) Impact of high-fat diet and obesity on energy balance and fuel utilization during the metabolic challenge of lactation. *Obesity (Silver Spring)* **20**, 65-75.
- Wang J., Liu R., Hawkins M., Barzilai N. & Rossetti L. (1998) A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* **393**, 684-8.
- Wang Y.Y., Wang Y.L., Li H.P., Zhu H.S., Jiang Q.D., Zhang L., Wang L.F., Han L.Q., Zhong K., Guo Y.J., Lu W.F., Li H.J. & Yang G.Y. (2011) Leptin mRNA expression in the rat mammary gland at different activation stages. *Genet Mol Res* **10**, 3657-63.
- Watson C.J. (2006) Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* **8**, 203.
- Wattez J.S., Delahaye F., Barella L.F., Dickes-Coopman A., Montel V., Breton C., Mathias P., Foligne B., Lesage J. & Vieau D. (2014) Short- and long-term effects of maternal perinatal undernutrition are lowered by cross-fostering during lactation in the male rat. *J Dev Orig Health Dis* **5**, 109-20.

- Wauters J. & Tavernier J. (2011) Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**, 2771-93.
- Widdowson E.M. & McCance R.A. (1963) THE EFFECT OF FINITE PERIODS OF UNDERNUTRITION AT DIFFERENT AGES ON THE COMPOSITION AND SUBSEQUENT DEVELOPMENT OF THE RAT. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **158**, 329-42.
- Wiesen J.F., Young P., Werb Z. & Cunha G.R. (1999) Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development* **126**, 335-44.
- William W.N., Jr., Ceddia R.B. & Curi R. (2002) Leptin controls the fate of fatty acids in isolated rat white adipocytes. *J Endocrinol* **175**, 735-44.
- Withers D.J., Gutierrez J.S., Towery H., Burks D.J., Ren J.M., Previs S., Zhang Y., Bernal D., Pons S., Shulman G.I., Bonner-Weir S. & White M.F. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900-4.
- Wolinski J., Biernat M., Guilloteau P., Westrom B.R. & Zabielski R. (2003) Exogenous leptin controls the development of the small intestine in neonatal piglets. *J Endocrinol* **177**, 215-22.
- Woodall S.M., Johnston B.M., Breier B.H. & Gluckman P.D. (1996) Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* **40**, 438-43.
- Woodward T.L., Xie J.W. & Haslam S.Z. (1998) The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 117-31.
- Yin W., Yuan Z., Wang Z., Yang B. & Yang Y. (2002) A diet high in saturated fat and sucrose alters glucoregulation and induces aortic fatty streaks in New Zealand White rabbits. *Int J Exp Diabetes Res* **3**, 179-84.
- Yonekura S., Sakamoto K., Komatsu T., Hagino A., Katoh K. & Obara Y. (2006) Growth hormone and lactogenic hormones can reduce the leptin mRNA expression in bovine mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol* **31**, 88-96.
- Yura S., Itoh H., Sagawa N., Yamamoto H., Masuzaki H., Nakao K., Kawamura M., Takemura M., Kakui K., Ogawa Y. & Fujii S. (2005) Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* **1**, 371-8.
- Yura S., Ogawa Y., Sagawa N., Masuzaki H., Itoh H., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Fujii S. & Nakao K. (2000) Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin. *J Clin Invest* **105**, 749-55.
- Zabeau L., Lavens D., Peelman F., Eyckerman S., Vandekerckhove J. & Tavernier J. (2003) The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett* **546**, 45-50.
- Zangani D., Darcy K.M., Shoemaker S. & Ip M.M. (1999) Adipocyte-epithelial interactions regulate the in vitro development of normal mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* **247**, 399-409.
- Zhang F., Basinski M.B., Beals J.M., Briggs S.L., Churgay L.M., Clawson D.K., DiMarchi R.D., Furman T.C., Hale J.E., Hsiung H.M., Schoner B.E., Smith D.P., Zhang X.Y., Wery J.P. & Schevitz R.W. (1997) Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* **387**, 206-9.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L. & Friedman J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-32.
- Zhao S., Chu Y., Zhang C., Lin Y., Xu K., Yang P., Fan J. & Liu E. (2008) Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **92**, 105-11.

ANNEXES

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES (2011-2014)

Journées Cunicoles (Le Mans, novembre 2011) - Communication orale

Gordon Research Mammary Gland Biology Conference (USA, juin 2013) - Poster

International Milk Genomics Consortium (Danemark, octobre 2014) - Poster

In Utero (Paris, octobre 2014) - Communication orale

Journées Francophones de Nutrition (Bruxelles, décembre 2014) - Communication orale et poster

PUBLICATIONS

- Andrey P., Kieu K., Kress C., Lehmann G., Tirichine L., Liu Z., Biot E., Adenot P.G., Hue-Beauvais C., Houba-Herlin N., Duranthon V., Devinoy E., Beaujean N., Gaudin V., Maurin Y. & Debey P. (2010) Statistical analysis of 3D images detects regular spatial distributions of centromeres and chromocenters in animal and plant nuclei. *PLoS Comput Biol* **6**, e1000853.
- Ballester M., Kress C., Hue-Beauvais C., Kieu K., Lehmann G., Adenot P. & Devinoy E. (2008) The nuclear localization of WAP and CSN genes is modified by lactogenic hormones in HC11 cells. *J Cell Biochem* **105**, 262-70.
- Chanat E., Aujean E., Balteanu A., Chat S., Coant N., Fontaine M.L., Hue-Beauvais C., Pechoux C., Torbati M.B., Pauloin A., Petitbarat M. & Devinoy E. (2006) [Nuclear organization and expression of milk protein genes]. *J Soc Biol* **200**, 181-92.
- Delpal S., Pauloin A., Hue-Beauvais C., Berthelot V., Schmidely P. & Ollivier-Bousquet M. (2012) Effects of dietary fish oil and corn oil on rat mammary tissue. *Cell Tissue Res*.
- Gonzalez C., Cuvellier S., Hue-Beauvais C. & Levi-Strauss M. (2003) Genetic control of non obese diabetic mice susceptibility to high-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* **46**, 1291-5.
- Gonzalez C., Menissier De Murcia J., Janiak P., Bidouard J.P., Beauvais C., Karray S., Garchon H.J. & Levi-Strauss M. (2002) Unexpected sensitivity of nonobese diabetic mice with a disrupted poly(ADP-Ribose) polymerase-1 gene to streptozotocin-induced and spontaneous diabetes. *Diabetes* **51**, 1470-6.
- Gourdou I., Paly J., Hue-Beauvais C., Pessemesse L., Clark J. & Djiane J. (2004) Expression by transgenesis of a constitutively active mutant form of the prolactin receptor induces premature abnormal development of the mouse mammary gland and lactation failure. *Biol Reprod* **70**, 718-28.
- Hue-Beauvais C., Chavatte-Palmer P., Aujean E., Dahirel M., Laigre P., Pechoux C., Bouet S., Devinoy E. & Charlier M. (2011) An obesogenic diet started before puberty leads to abnormal mammary gland development during pregnancy in the rabbit. *Dev Dyn* **240**, 347-56.
- Hue-Beauvais C., Pechoux C., Bouguyon E., Chat S., Truchet S., Pauloin A., Le Gouar Y. & Ollivier-Bousquet M. (2007) Localisation of caveolin in mammary tissue depends on cell type. *Cell Tissue Res* **328**, 521-36.
- Karray S., Kress C., Cuvellier S., Hue-Beauvais C., Damotte D., Babinet C. & Levi-Strauss M. (2004) Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *J Immunol* **172**, 2118-25.
- Koch E., Hue-Beauvais C., Galio L., Solomon G., Gertler A., Revillon F., Lhotellier V., Aujean E., Devinoy E. & Charlier M. (2013) Leptin gene in rabbit: cloning and expression in mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *Physiol Genomics*.
- Levi-Strauss M., Beauvais C. & Karray S. (2001) Identification of a polymorphic microsatellite marker in the mouse Fas ligand gene. *Eur J Immunogenet* **28**, 553-5.
- Montazer-Torbati M.B., Hue-Beauvais C., Droineau S., Ballester M., Coant N., Aujean E., Petitbarat M., Rijnkels M. & Devinoy E. (2008) Epigenetic modifications and chromatin loop organization explain the different expression profiles of the Tbrg4, WAP and Ramp3 genes. *Exp Cell Res* **314**, 975-87.
- Pauloin A., Chat S., Pechoux C., Hue-Beauvais C., Droineau S., Galio L., Devinoy E. & Chanat E. (2010) Oleate and linoleate stimulate degradation of beta-casein in prolactin-treated HC11 mouse mammary epithelial cells. *Cell Tissue Res* **340**, 91-102.

- Petridou B., Soulier S., Besnard N., Hudrisier M., Hue-Beauvais C., Costa Da Silva J., Djiane J. & Vilotte J.L. (2003) Heterogeneous inducible mammary-specific expression of Jab/SOCS1 in lactating transgenic mice is associated with no obvious phenotype, even at the cellular level. *Transgenic Res* **12**, 693-706.
- Rijnkels M., Kabotyanski E., Montazer-Torbati M.B., Hue Beauvais C., Vassetzky Y., Rosen J.M. & Devinoy E. (2010) The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 85-100.
- Vandiedonck C., Beaurain G., Giraud M., Hue-Beauvais C., Eymard B., Tranchant C., Gajdos P., Dausset J. & Garchon H.J. (2004) Pleiotropic effects of the 8.1 HLA haplotype in patients with autoimmune myasthenia gravis and thymus hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15464-9.

RESEARCH ARTICLE

An Obesogenic Diet Started Before Puberty Leads to Abnormal Mammary Gland Development During Pregnancy in the Rabbit

Cathy Hue-Beauvais,¹ Pascale Chavatte-Palmer,² Etienne Aujean,¹ Michèle Dahirel,² Patrice Laigre,³ Christine Péchoux,¹ Stephan Bouet,⁴ Eve Devinoy,¹ and Madia Charlier^{1*}

Alterations to the metabolic environment during puberty can impact future lactation efficiency and mammary tumorigenesis. During this study, we used a model of rabbits receiving an obesogenic diet (OD), starting before puberty and extending until mid-pregnancy. Three months later, the body weight of OD animals was significantly higher than that of controls and their mammary glands displayed a precocious and abnormal development at mid-pregnancy. OD mammary ducts were filled with dense products, while alveolar structures invaded most of the fat pad. The proportion of secretory epithelium was significantly higher in OD mammary tissue, which contained an abundant accumulation of milk proteins and lipids. In conclusion, an obesogenic diet started before puberty induced an accelerated development of the rabbit mammary gland, leading to an accumulation of secretory products at mid-pregnancy. These results support the critical influence of nutrition on mammary growth and differentiation, which may be deleterious to mammary development and subsequent lactation. *Developmental Dynamics* 240:347–356, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: obesogenic diet; mammary gland; mid-pregnancy; secretory epithelium; milk protein; rabbit

Accepted 2 December 2010

INTRODUCTION

Mammary gland development occurs over a long period of time, starting in fetal life and following successive bursts of development and involution, during either ovarian or pregnancy-lactation-involution cycles. At birth, the mammary gland consists of a small number of rudimentary ducts embedded in subcutaneous white adipose tissue. During puberty, the mammary gland develops to become a

branched epithelial network of ducts that can support larger alveolar development during pregnancy and allow subsequent milk production during lactation (Howlin et al., 2006). Mammary epithelial growth and differentiation are tightly modulated by several hormonal and metabolic signals (Hennighausen and Robinson, 2005). Thus, age and body weight may be important factors for mammary development, so that nutrition

during the major developmental steps of this organ may be of critical importance (Sejrsen, 1994).

In order to understand the impact of nutrition on mammary gland development and lactation, changes to the nutritional status of various animal models have been made in order to alter the metabolic environment. In cattle, an increased growth rate due to a high feeding level during puberty was able to reduce mammary epithelial

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

¹Génomique et Physiologie de la Lactation, INRA, UR1196, Jouy-en-Josas, France

²Biologie du Développement et Reproduction, INRA, UMR1198, Jouy-en-Josas, France

³Unité Commune d'Expérimentation Animale de Vilvert, INRA, UE920, Jouy-en-Josas, France

⁴Génétique Animale et Biologie Intégrative, INRA, UMR1313, Jouy-en-Josas, France

Grant sponsor: Animal Physiology and Livestock Systems (PHASE) Division of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

*Correspondence to: Madia Charlier, Batiment 440, Domaine de Vilvert, F78350, Jouy-en-Josas, France.

E-mail: madia.charlier@jouy.inra.fr

DOI 10.1002/dvdy.22536

Published online 12 January 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

cell proliferation in areas of active ductal expansion and thus limit mammary development and subsequent milk potential (Davis Rincker et al., 2008; Sejrsen et al., 2000). The effects of obesity on lactogenesis have also been demonstrated in the rat, where this pathology was shown to affect the chances of a successful outcome to pregnancy and lactation (Rolls et al., 1984). Similarly, in mice, diet-induced obesity resulted in lactation failure. More specifically, obese mice displayed marked abnormalities in alveolar development of the mammary gland during pregnancy, together with a marked decrease in major milk protein expression (Flint et al., 2005). Moreover, during earlier stages of development (puberty), obesity was shown to disrupt mammary ductal growth by reducing the branching frequency and width of ducts (Kamikawa et al., 2009). In humans, obesity is considered to be a major worldwide health issue and a predisposing risk for the morbidity of type 2 diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases. Obesity has also been strongly correlated with an increased risk of mammary tumorigenesis (Stoll, 2000). Furthermore, in the United States, Chapman and Pérez-Escamilla noted that women who were overweight or obese at the time of childbirth were at significant risk of failing to initiate successful lactation, or were no longer breastfeeding at two days postpartum (Chapman and Perez-Escamilla, 1999). Similarly, a European study of obese women (BMI >26 kg/m²) found an association between obesity and an early cessation of breastfeeding (Riva et al., 1999) and a decrease in the normal prolactin response to suckling (Rasmussen and Kjolhede, 2004).

All these studies described the effects of obesity at puberty or after puberty on mammary gland development and lactation. The present study was designed to analyze precisely the effects on mammary gland development at mid-pregnancy of a high-fat/high-sugar diet administered prior to puberty, and to develop a nutritional model that more closely resembled the human obesity condition during adolescence. Mammary gland development has been described extensively in the rabbit (Denamur, 1963),

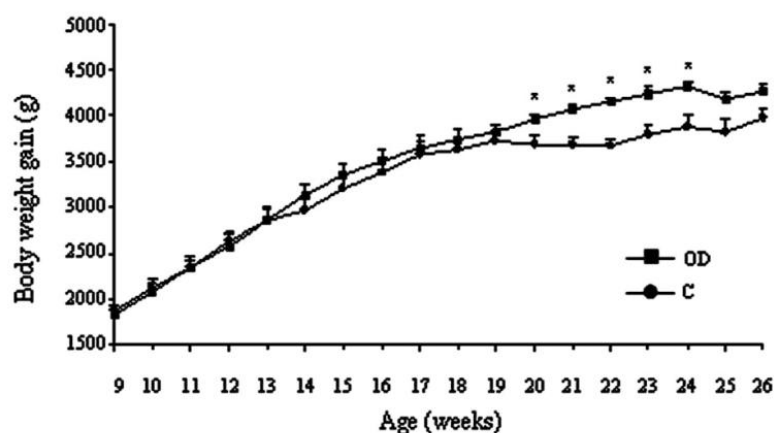


Fig. 1. Body weight changes in female rabbits receiving either the control (C) diet ($n=5$) or the obesogenic (OD) diet ($n=4$) from 9 to 26 weeks of age (mid-pregnancy). * $P < 0.05$.

together with secretion of the main milk proteins (Houdebine et al., 1985; Devinoy et al., 1988). Furthermore, fat development in this species is abdominal and interscapular and can thus be easily evaluated. The rabbit also appears to be a relevant model for human physiology since the rabbit-primate phylogenetic distance is the same as the rodent-primate distance (Graur et al., 1996). However, because rodent sequences have evolved more rapidly, rabbit gene sequences are more similar to human sequences than to those of rodents (Graur et al., 1996), which might be of considerable importance to further analyses of altered gene expression profiles in human pathologies. By subjecting female rabbits to a high-fat/high-sugar obesogenic diet from an early age (before puberty) and by evaluating their mammary development on Day 14 of pregnancy, we were able to show that an obesogenic diet induced morphological and functional changes in the mammary tissue at mid-pregnancy, which could perhaps lead to lactation defects.

RESULTS

Body Weight and Food Intake

Before the age of 19 weeks, the weight of the rabbits did not differ statistically between females receiving the control (C) or high-fat/high-sugar (OD) diets started at 8 weeks of age (Fig. 1). Thereafter, during the 4 weeks before mating, body weight

became significantly higher in OD animals than in C animals. Before puberty, which occurs at between 9–13 weeks of age, and before mating (at between 19–23 weeks), the total energy intake was significantly increased in OD rabbits compared to C-fed animals. By contrast, OD rabbits displayed no difference in calorie intake between 14–18 weeks and during early to mid-pregnancy (24–25 weeks) (Table 1), because the food intake (g) decreased in this OD group.

Number of Fetuses, Fetal and Placental Growth, and Adipose Tissue

Nine female rabbits were mated at 24 weeks of age (4 OD and 5 C animals) and were then sacrificed on Day 14 of pregnancy. The number of fetuses per doe did not differ significantly between the two groups (Fig. 2A), nor did the weight of placentas (Fig. 2C). However, the mean fetal weight was significantly lower in the OD group (0.245 ± 0.012 g in OD vs. 0.279 ± 0.009 g in C rabbits, $P < 0.03$, Fig. 2B).

As shown above, body weight was significantly higher in OD animals as from 19 weeks of age. It could be inferred that the increase in body weight was the result of increased body fat mass, since the TOBEC measurement was greater in OD animals ($7.5 \pm 0.3\%$ fat in OD vs. 6.6 ± 0.4 in C, $P = 0.03$). Differences in the weights of major organs (kidney, liver, and

TABLE 1. Energy Intake (total kcal per rabbit) per Each Five-week Period from the Age of Puberty to Mid-pregnancy in Control (n=5) and OD (n=4) Animals^a

Age (weeks)	9–13	14–18	19–23	24–25
Control (kcal)	2734 ± 117	2800 ± 151	2244 ± 138	2270 ± 185
OD (kcal)	3146 ± 116	3098 ± 200	2800 ± 114	1816 ± 218
C versus OD	P < 0.002	NS	P < 0.001	NS

^aData are means ± SEM.

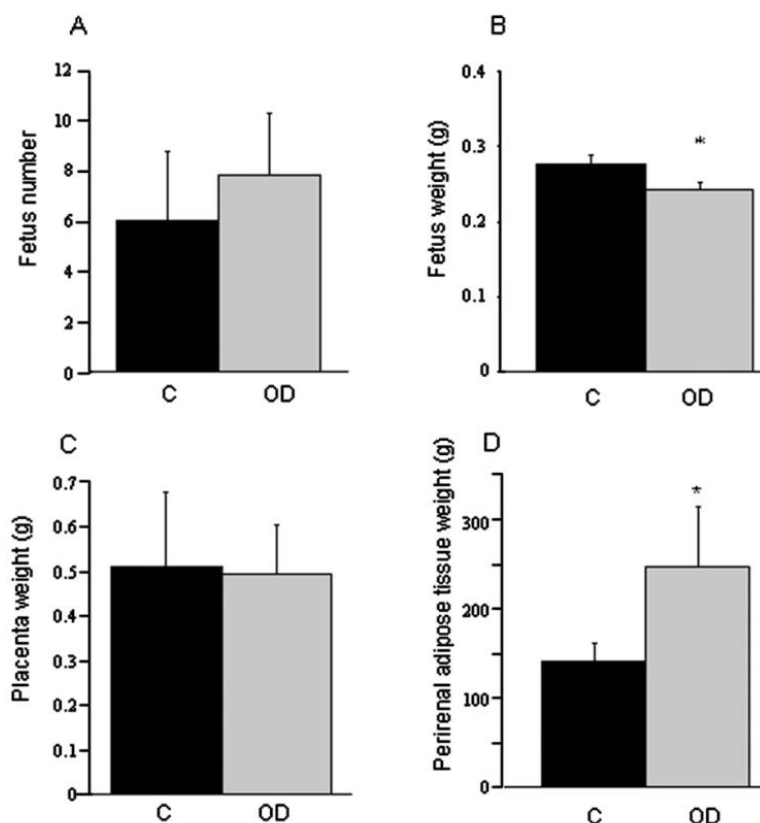


Fig. 2. Post-mortem observations of D14 pregnant female rabbits fed either the control (C) (n=5) or the obesogenic diet (OD) (n=4). Values are shown as means ± SEM. *P < 0.05. **A:** Fetus number/doe. **B:** Individual fetus weight. **C:** Placenta weight/doe. **D:** Perirenal adipose tissue weight/doe.

muscle) were not observed. In rabbits, adipose tissue is mainly perirenal and interscapular. After sacrifice, both types of adipose tissue were dissected and weighed. Perirenal adipose tissue was significantly heavier in the OD group (247.6 ± 39.2 g in OD vs. 141.6 ± 9.9 g in C rabbits, $P < 0.05$, Fig. 2D), whereas no significant difference in the weight of interscapular adipose tissue was observed.

Mammary Gland Development

Histological examinations of thin sections of mammary tissue from control and OD animals were performed on Day 14 of pregnancy (Fig. 3 and see Supp. Fig. S1, which is available online) and revealed striking differences between the two groups. Alveolar secretory structures were isolated in

control animals, whereas they invaded the fat pad in OD rabbits, as observed in both global sections (Fig. 3Aa, Ab) and at higher magnification (Fig. 3Ba and Bb). Moreover, the ducts were empty in C rabbit mammary glands observed at both low and high magnification (Fig. 3Ac and Bc, respectively) whereas in the OD group they were characterized by abundant products within the lumen (Fig. 3Ad and Bd).

Morphological differences were evaluated using a quantitative analysis based on the ratio between alveolar areas per section and total section areas. This analysis revealed a significantly increased mammary epithelial content in OD rabbits ($29.93 \pm 2.90\%$ of epithelial tissue) compared to C animals ($17.94 \pm 1.18\%$, $P < 0.001$). Mammary epithelial cell proliferation was quantified using Ki-67 staining. No significant difference was observed between C and OD animals ($1.51 \pm 0.49\%$ and $3.17 \pm 1.75\%$ in C and OD rabbits, respectively).

Electron microscopy analysis also revealed morphological features that differed as a function of diet. In C females, the mammary epithelial cells (MEC) surrounding the lumen (L) contained large lipid droplets (ld) at the apex (Fig. 4A). The lumina contained a small quantity of granular, electron-dense material in which a few casein micelles and rare lipid droplets were embedded (Fig. 4A). By contrast, the lumina of OD mammary glands contained a huge amount of casein micelles as well as large lipid droplets buried in a fibrillar material (Fig. 4B).

These findings support the observation that a high-fat/high-sugar diet had markedly modified mammary gland development and induced an abnormal secretion of large lipid droplets and numerous micelles, which were detected in the alveolar and ductal lumina.

Expression and Localization of Milk Proteins and Lipids

In order to investigate the biochemical consequences of the abnormal mammary development caused by a high-fat/high-sugar diet, milk protein accumulation in mammary gland

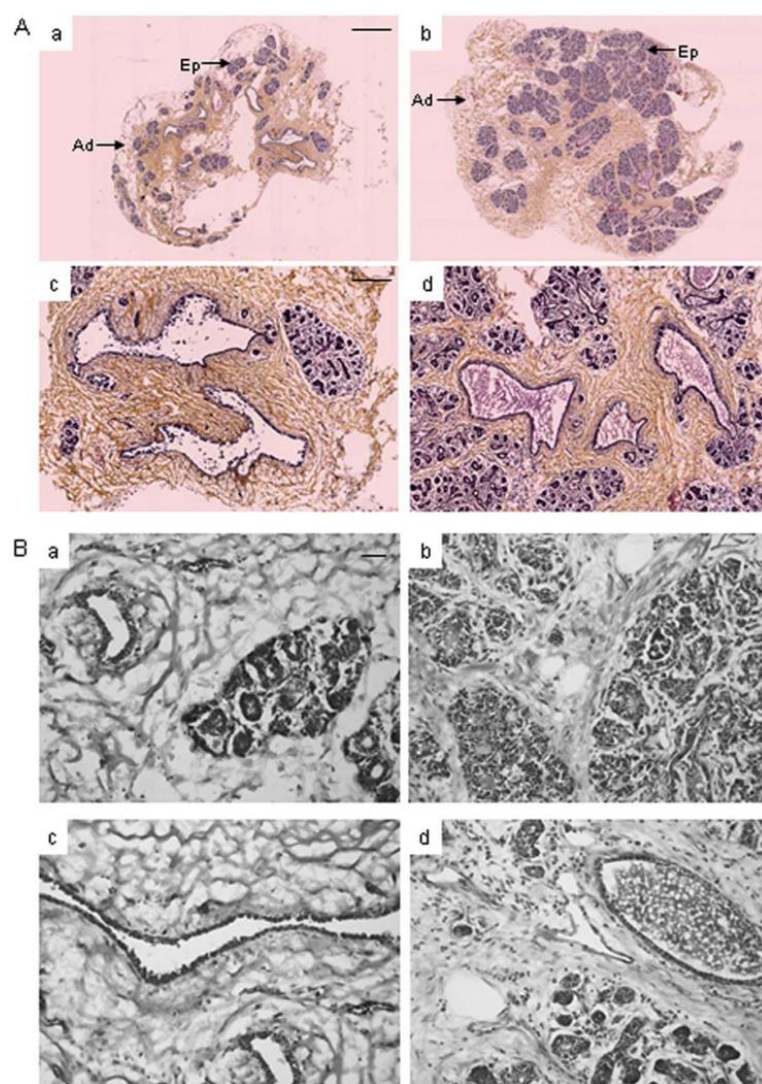


Fig. 3. Hematoxylin & Eosin staining on histological cryosections of mammary glands from C (a, c) and OD (b, d) rabbits on Day 14 of pregnancy observed at different magnifications. **A:** Representative nanoscan images of total (a and b) and low-magnified (c and d) sections. Scale bar = 50 μ m and 200 μ m, respectively. **B:** Representative images using a higher magnification (Leica Microscope). Arrows indicate mammary epithelial (Ep) and adipose (Ad) tissues. Scale bar = 50 μ m.

extracts was evaluated using a Western blot procedure. AlphaS1-casein (the major milk protein in rabbit milk), κ -casein (the protein that enables the formation of casein micelles), and Whey Acidic protein (WAP, the major protein of the whey fraction) were studied. As shown in Figure 5, Western blot analysis of three out of four protein extracts from OD mammary glands revealed clear bands.

Some of them co-migrated with those observed in milk and corresponded to α S1- and κ -caseins and WAP. Such bands were barely observed in the mammary gland of control animals for equivalent amounts of protein loaded onto the gels (15 μ g), as confirmed by BCA quantification and Coomassie blue staining (Supp. Fig. S2). For caseins, different band patterns were observed in milk and the

OD group. They reflected either polymorphisms, largely described in this species (Chanat et al., 1999), or potential post-translational modifications as predicted from genomic sequences. These results are in agreement with previous studies showing that for the major caseins, several bands can be detected using immunoelectrophoresis in rabbit mammary extracts (Baranyi et al., 1995; Bösze et al., 2000) and are not observed in milk.

The localization of these proteins was examined by immunohistochemical analyses using the same α S1-, κ -casein, and WAP-specific antibodies as above. As expected at mid-pregnancy, positive staining for each milk protein was detected inside the alveolar lumina of both C and OD animals (Fig. 6). However, a strong positive signal was observed specifically in the lumina of ducts from OD rabbits (Fig. 6B, E, H), while the ducts of C animals displayed a reduced signal (Fig. 6A, D, G). These results suggest an accumulation of secreted milk proteins in the mammary glands of OD rabbits. Specific lipid staining (Bodipy) revealed numerous fat globules in the mammary ducts of OD animals but not in control rabbits (Fig. 7), confirming the presence of secreted lipids in the lumina of OD rabbits.

DISCUSSION

The present study reports the effects on mammary gland development in the rabbit of a high-fat/high-sugar diet started before puberty. This model was chosen because it could mimic human obesity during adolescence. Indeed, 24 weeks of age in rabbit development can be considered to be approximately 18 years of age in humans, and in our experiments the cafeteria diet was started before puberty and was withdrawn at a young adult age. Female rabbits fed this obesogenic diet grew initially at the same rate as the controls but they had become significantly heavier by 19 weeks of age. This increase appeared to be due entirely to increased amounts of body fat adipose tissue as compared to controls. The rabbits were mated at 24 weeks of age and sacrificed on Day 14 of pregnancy. Their fertility and prolificacy did not appear to be affected. Even if the

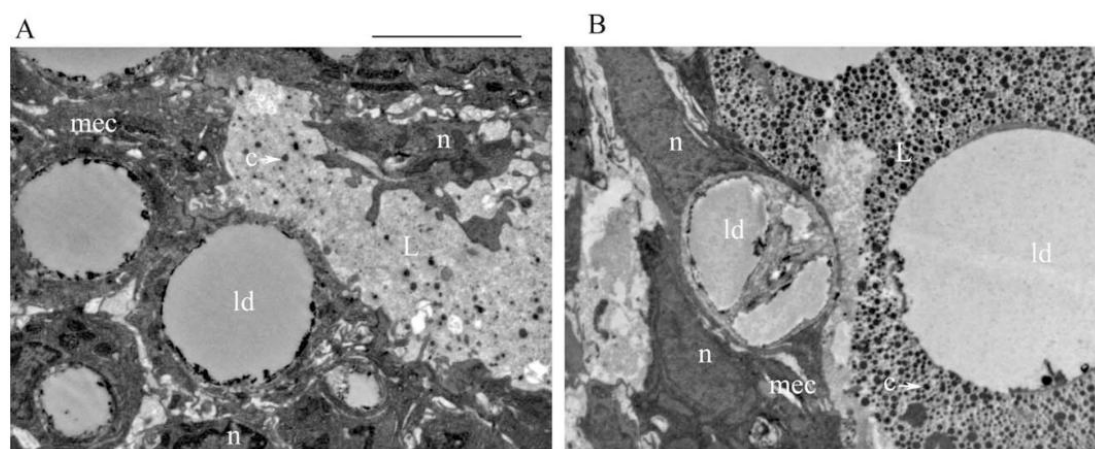


Fig. 4. Representative ultrastructural morphology of mammary glands from C (A) and OD (B) rabbits on Day 14 of pregnancy. Control rabbits display an electron-dense lumen (L) containing few casein micelles (c and arrow). Mammary epithelial cells (MEC) contain lipid droplets (ld) at the apex. By contrast, in OD rabbits the lumen (L) is full of casein micelles (c and arrow) and enlarged lipid droplets (ld). n, nucleus. Scale bar = 5 μ m.

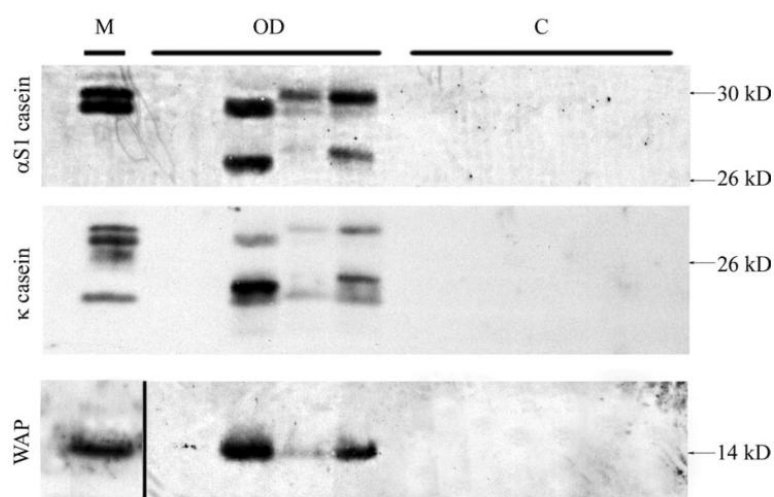


Fig. 5. Western blot analysis of three of the main milk proteins (α S1- and κ -caseins and WAP) in mammary gland protein extracts (15 μ g) from rabbits on Day 14 of pregnancy, fed with either the control (C) (n=5) or the obesogenic diet (OD) (n=4). Rabbit milk (M) was used as a positive control. For the detection of WAP, the control milk well was exposed 4-fold less than the mammary gland extracts because of the low WAP content in mammary extracts. The migration of molecular weight markers is indicated on the right-hand side.

target of our study was not to examine reproductive phenomena in detail, fetal intra-uterine growth retardation was observed, despite a similar placental weight, thus illustrating a possible decrease in placental efficiency in OD rabbits (Picone et al., 2011). These observations are in agreement with similar reports on different species in which obesity led to low birth weight (Rolls et al., 1984; Flint et al., 2005).

Histological and biochemical analyses revealed clearly that an obesogenic diet had strongly modified mammary development at mid-pregnancy. The mammary tissue of OD animals was characterized by ducts filled with abundant secretion products and developed alveoli invading the fat pad. Preliminary data (not shown) tended to indicate that this altered mammary phenotype was already observed at earlier stages of

pregnancy and could be related to a modification of the hormonal status of the animals. Indeed, it is known that ovarian and pituitary hormones act according to a precise chronology to control mammary epithelial growth and differentiation. Any modification to this endocrine equilibrium may impact lobulo-alveolar formation during pregnancy and subsequent lactation (Sternlicht et al., 2006). A similar abnormal mammary phenotype had previously been reported in transgenic mice over-expressing a constitutively active prolactin (PRL) receptor (Gourdou et al., 2004), suggesting that the alterations observed in the mammary glands of OD rabbits may be related to a modification of the PRL pathway. However, no differences in the localization of the PRL receptor, or in the phosphorylation of Stat5, were observed between the two groups during preliminary immunolocalization and Western blot experiments (data not shown), but we cannot exclude an alteration to either the expression of the prolactin receptor or its signaling pathway in response to acute PRL stimulation in the OD group (Nevalainen et al., 2002). Furthermore, obesity has been shown to strongly modify the expression profile of numerous adipokines, which are integrated in a communication network between numerous organs, including the mammary gland (Ronti et al., 2006). In particular, leptin has been shown to act as an autocrine and

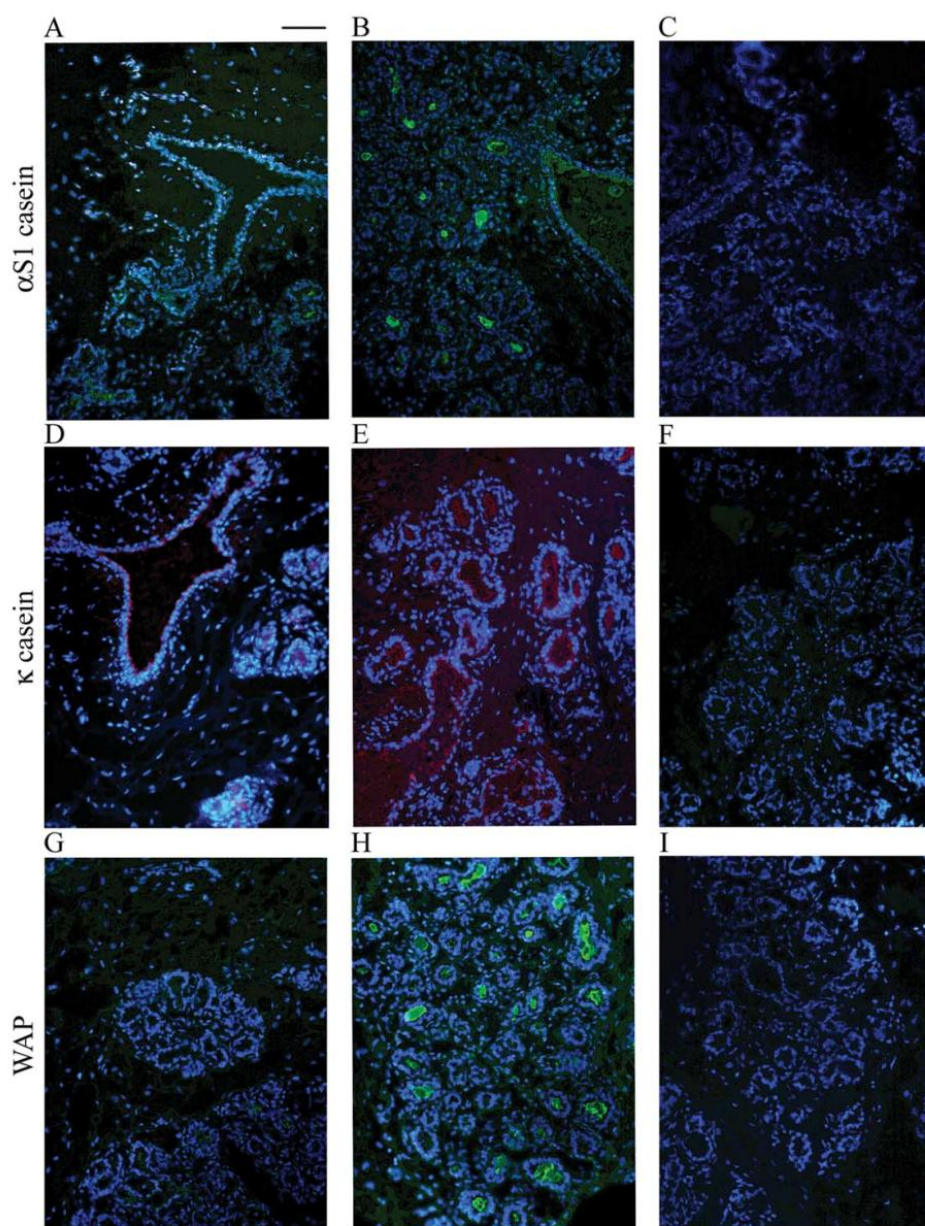


Fig. 6.

paracrine factor to influence the development and differentiation of mammary gland (Hu et al., 2002; Silva et al., 2008). Considering that leptinemia is correlated to fat mass, high levels of leptin could be expected in OD rabbits. Such a hypothesis is supported by preliminary results obtained in mammary glands of rabbits during early pregnancy (data not shown). Moreover, previous studies

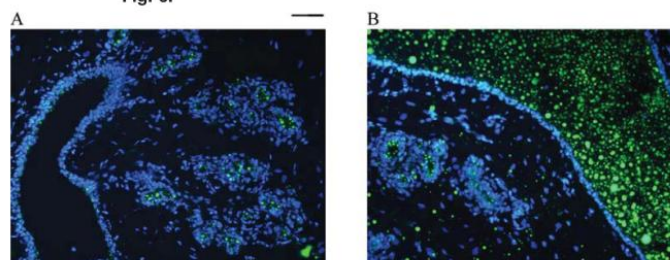


Fig. 7.

showed that leptin administration during pregnancy and lactation was able to rescue lactation failure observed in leptin-deficient *ob/ob* mice (Chehab et al., 1996; Malik et al., 2001). These findings clearly demonstrate that leptin is required during pregnancy and after parturition to ensure development of the mammary gland and the establishment of lactation (Malik et al., 2001). The mechanism by which leptin regulates mammary growth, and in particular the existence of a direct and/or indirect effect on mammary epithelial cells, is still largely unknown even though many hypotheses have been formulated (Kamikawa et al., 2009; Thorn et al., 2006, 2010).

At mid-pregnancy in the present case, the proportion of the mammary gland occupied by epithelial tissue was higher in OD rabbits, thus demonstrating enhanced mammary tissue development in these animals. However, at this stage, proliferation of the mammary epithelial cells has not been observed, as shown by Ki-67 immunostaining, which exhibited no difference between the two groups. Previous studies by our group had established that the higher levels of Ki-67 labeling in rabbit mammary gland were observed during the first week of pregnancy (data not shown). It is thus likely that increased epithelial development might be the result of an intense proliferation that had occurred earlier in pregnancy.

However, our data contrasted with some findings previously reported using different animal models, although the diets used were similar. In mouse models fed a high-fat/high-sugar cafeteria-type diet starting at or after puberty, impaired mammary development was observed before pregnancy (Kamikawa et al., 2009), at mid-pregnancy and during lactation,

together with reduced milk protein expression leading to lactation failure (Flint et al., 2005). In our case, the diet was started before puberty, whereas in the rodent model the obesity-inducing diet was introduced at or after puberty. One possibility to explain this discrepancy between the findings may have been the age of the animals when the high-fat/high-sugar diet was introduced, which could be crucial. Moreover, possible differences among species can cause speculation, related to specific endocrine profiles and subsequent hormonal regulation and adipose tissue distribution. Indeed, the adipose tissue distribution we observed differed quite markedly from that observed in rodents fed the cafeteria-type diet. Indeed, in rodents fed a cafeteria-type diet (Flint et al., 2005), mammary adipose tissue was intra-epithelial whereas in the rabbit it remained peri-epithelial. The rabbit phenotype appears to be closer to the human situation where adipose deposits in specific regions of the body (including the mammary gland) can be observed, even in the absence of massive obesity.

In cattle, several studies have demonstrated the deleterious effects on mammary growth and milk composition of prepubertal feeding with a high-energy diet. In particular, elevated nutrient intake reduces prepubertal mammary development by impairing epithelial cell proliferation (Brown et al., 2005; Sejrsen and Purup, 1997). However, when a high-energy diet was introduced during gestation, lactation efficiency increased (Park, 2005), thus revealing the importance of the reproductive status of animals in the event of nutritional changes.

Although it is not possible to infer future milk production from the data presented here, we demonstrated important qualitative and quantitative

variations in milk protein levels in high-fat/high-sugar-fed rabbits at mid-pregnancy, and in particular a precocious expression of α S1- and κ -caseins and WAP. This accelerated milk protein expression, and the increased mammary duct lipid content, could lead to subsequent lactation deficiencies. Indeed, lactation failure has been induced by over-expressing WAP in the pig and mouse at early stages of pregnancy (Shamay et al., 1992; Burdon et al., 1991, 1999).

In conclusion, the data presented in this report strongly support a critical effect on mammary gland differentiation of high-fat/high-sugar nutrition starting before puberty and continuing throughout pregnancy. However, the differences that we observed at mid-pregnancy may have reflected the effects of diet on mammary development during puberty, or during pregnancy, or both. Thus, a better understanding of the importance of both these periods to mammary gland differentiation is clearly an important future goal. Moreover, it is tempting to speculate that the accelerated mammary gland development at mid-pregnancy that was demonstrated during this study may have important effects on milk quantity and/or composition, a factor that is currently under study.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and Experimental Design

All animal studies were carried out in compliance with French regulations on animal experimentation and with the authorization of the French Ministry of Agriculture (Animal Health and Protection Directorate, accreditation number 78-119).

Ten female rabbits (New Zealand White, 1077-INRA) were housed individually in an indoor facility under controlled light conditions (8 hr light/16 hr darkness except from the week before mating when they were under 16 hr light/8 hr darkness) and temperature (18°C). Before puberty, at the age of 8 weeks, the rabbits were randomly divided into two groups: one group was fed ad libitum with a

Fig. 6. Immunolocalization of three major milk proteins in rabbit mammary gland on Day 14 of pregnancy. Secondary antibodies were conjugated with either FITC (green) for α S1-casein and WAP or TRITC (red) for κ -casein. Control (A, D, G) and OD (B, E, H) rabbits are represented for each protein: α S1-casein (Line A-C), κ -casein (Line D-F), and WAP (Line G-I). Negative controls are also represented for each protein: α S1-casein (C), κ -casein (F), and WAP (I). Alveolar and mammary ducts are focused in each group. DAPI was used to stain the nuclei (blue). Scale bar = 100 μ m.

Fig. 7. Bodipy staining of lipid droplets in the lumen of mammary ducts from C (A) or OD (B) rabbits on Day 14 of pregnancy. DAPI was used to stain the nuclei (blue). Scale bar = 100 μ m.

TABLE 2. Composition and Energy Content of the Control (C) and Obesogenic Diets (OD)

	C	OD
Theoretical chemical composition		
Digestible energy (Kcal/kg)	2378	2808
Fat (%)	2.03	7.65
Sugar (%)	3.55	13.09
Rough cellulose (%)	14.2	13.5
Starch (%)	19.43	11.45
Ca (g/Kg)	8.02	7.91
P (g/Kg)	6.67	6.09
K (g/Kg)	9.99	9.99
Acid detergent fiber (%)	16.53	15.89
Neutral detergent fiber (%)	29.7	27.3
Lignin (%)	3.57	3.37
Crude protein (%)	18.08	16.48
Digestible protein (%)	13.9	12.75
Methionin (g/Kg)	3.59	3.31
Methionin+cystein (g/Kg)	8.79	3.08
Lysin (g/Kg)	8.55	7.94

custom-made standard laboratory diet designed to satisfy their needs (Control Diet, C; De Blas and Mateos, 2010) whereas the other group was fed an obesogenic cafeteria-type diet (OD) based on the control diet and adapted from that described by Guo and Jen (1995) (Table 2). The obesogenic diet, increased in energy levels (+18% compared to the control diet), was supplemented with lard (60 g/1,000 g, +276% fat compared to the control diet) and beet sugar (100 g/1,000 g, +269% carbohydrates compared to the control diet). Food intake and body weight were monitored on a weekly basis. Adiposity was measured in vivo at 11, 14, and 19 weeks of age using total body electrical conductivity (TOBEC), as recently established in a rabbit model (Fortun-Lamothe et al., 2002). After 16 weeks of the diet (24 wk of age), nine females were mated (one female died, an event not linked to the diet) and on Day 14 of pregnancy they were sacrificed. Mammary tissue, placenta, fetuses, liver, kidneys, and adipose tissue (perirenal and interscapular) were collected and weighed. Mammary samples were subsequently stored, fixed, or snap-frozen until use.

Histological and Ultrastructural Analyses

Abdominal mammary glands were dissected and the adipose tissue and

muscle were removed. In each animal, the left lower mammary gland was excised and divided into several samples. For histology and immunohistochemistry, mammary samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at 4°C. The samples were then cryoprotected in 40% sucrose, embedded in TissuTek (Sakura, Torrance, CA), and kept in liquid nitrogen before storing at -80°C. Five-micrometer-sections, lying at least 100 μ m apart, were mounted on slides. For histology, the slides were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E, Sigma, Saint Quentin fallavier, France) and then either examined under bright-light microscopy or digitalized using a Hamamatsu nanozoomer (Tokyo, Japan). The latter technique enabled observation of the entire section. Five sections per rabbit were processed and the images were analyzed using both the Hamamatsu Nanozoomer Digital Pathology Virtual Slide Viewer and Image J software. Areas occupied by mammary epithelial tissue were measured and divided by the whole section area to generate the proportion of epithelial tissue.

For Transmission Electron microscopy experiments, the tissues were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodiumcacodylate buffer, pH 7.2, for 4 hr at room temperature, and then post-fixed with 1% osmium tetroxide containing 1.5% potassium cyanoferrate, gradually dehydrated in ethanol

(30 to 100%), and embedded in Epon (Delta Microscopy, Ayguesvives, France). Thin sections (70 nm) were collected on 200-mesh copper grids, and counterstained with lead citrate before examination with a Zeiss EM902 electron microscope operated at 80 kV (Carl Zeiss, France). Images were acquired with a charge-coupled device camera (Megaview III) and analyzed with ITEM Software (Eloise, France) at the MIMA2 facilities (UR1196 Génomique et Physiologie de la Lactation, INRA, Plateau de Microscopie Electronique, F78350 Jouy-en-Josas, France).

Immunohistochemical Analysis

The main milk protein and prolactin receptors were localized by immunohistochemical analyses using the following dilutions of primary antibodies: guinea pig anti-rabbit- α S1-casein (1:500), guinea pig anti-rabbit WAP (1:500) antibodies (Grabowski et al., 1991), sheep antiserum rabbit κ -casein (1:400, Baranyi et al., 1995), and S46 serum developed against purified PRL-R (Waters et al., 1995). Briefly, 5- μ m frozen sections were treated in 50 mM ammonium chloride for 30 min followed by permeabilization in 2% BSA, 0.05% saponin, and 0.05% sodium azide in PBS 1 \times for 1 hr. Primary antibodies were diluted in the same buffer and then added to the tissue sections for 1 hr at room temperature. Antibody binding was visualized with fluorescence-labeled secondary antibodies (anti-guinea pig FITC-conjugated, 1:300, and anti-sheep TRITC-conjugated, 1:300, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA), applied to the sections in PBS 1 \times for 45 min. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) was diluted 1:500 in PBS 1 \times and applied for 3 min at room temperature.

To evaluate epithelial cell proliferation, mammary gland sections were stained with monoclonal mouse anti-rat Ki-67 (1:100, Dako, Trappes, France) and revealed with fluorescence-labeled secondary antibody (anti-mouse FITC-conjugated, 1:300, Jackson Immunoresearch).

For lipid staining, frozen sections were incubated for 20 min with 0.5 μ g/ml Bodipy 493/503 (Molecular

Probes, Cergy Pontoise, France). For observations, the slides were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and observed with a Leica DMRB microscope coupled with a DP50 Olympus Camera (Tokyo, Japan).

Western Blot Analysis

Protein extracts from each rabbit mammary gland were prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1% NP40, and 10% glycerol, containing protease and phosphatase inhibitors (Complete Mini and PhoSTOP, Roche, Meylan, France). Their protein concentration was determined using the BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, France). Proteins (15 μ g) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose filters (Protran, Schleicher & Schuell, France). The membranes were saturated for 1 hr in blocking solution (TBS-T: 50 mM Tris pH7.4, 200 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5% defatted milk) and incubated overnight with the primary antibodies at 4°C. After incubation, the membranes were washed with TBS-T and incubated at room temperature with horseradish peroxidase-linked secondary antibody for 45 min. Immune complexes were detected using the ECL kit for autoradiography (GE Healthcare, France). For each experiment, equal protein loading between the different wells and the different gels was verified by Coomassie blue staining. The following specific antibodies were used: guinea pig anti-rabbit- α S1-casein (1:5,000), guinea pig anti-rabbit WAP (1:5,000) antibodies (Grabowski et al., 1991), and sheep anti-rabbit κ -casein (1:5,000) serum (Baranyi et al., 1995). The secondary antibodies used for immunoblotting were: anti-guinea pig (1:5,000) and anti-sheep horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (1:10,000) (Sigma, France).

Data Analysis

Experimental data are presented as means \pm SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed to detect significant intergroup differences using either

unpaired Student's *t*-test when the sample size was >30 , or the Mann-Whitney U-test when the sample size was <30 (Georgin and Gouet, 2000). $P \leq 0.05$ was considered to be significantly different.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Laurence Lamothe from INRA for her help in designing the obesogenic diet and for the staff of the Unité Commune d'Expérimentation Animale of INRA, and in particular, Michel Baratte and Gilbert Boyer, for animal care. We thank Dr. Jean Djiane for his precious advice. We are also grateful to Dr. Louis-Marie Houdebine for the gift of guinea pig anti-rabbit α S1 casein.

REFERENCES

- Baranyi M, Brignon G, Anglade P, Ribadeau-Dumas B. 1995. New data on the proteins of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111:407–415.
- Bösze Z, Hiripi L, Virág G, Tóth S, Makovic F, Fontaine ML, Devinoy E. 2000. Polymorphism of the rabbit kappa casein gene and its influence on performance traits. *Pflugers Arch* 439:R2–3.
- Brown EG, Vandehaar MJ, Daniels KM, Liesman JS, Chapin LT, Forrest JW, Akers RM, Pearson RE, Nielsen MS. 2005. Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves. *J Dairy Sci* 88: 595–603.
- Burdon T, Wall RJ, Shamay A, Smith GH, Hennighausen L. 1991. Over-expression of an endogenous milk protein gene in transgenic mice is associated with impaired mammary alveolar development and a milchlos phenotype. *Mech Dev* 36:67–74.
- Burdon T, Sankaran L, Wall RJ, Spencer M, Hennighausen L. 1999. Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation. *J Biol Chem* 266:6909–6914.
- Chanat E, Martin P, Ollivier-Bousquet M. 1999. Alpha(S1)-casein is required for the efficient transport of beta- and kappa-casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 112:3399–3412.
- Chapman DJ, Pérez-Escamilla R. 1999. Identification of risk factors for delayed onset of lactation. *J Am Diet Assoc* 99: 450–454; quiz 455–456.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12:318–320.
- Davis Rincker LE, Weber Nielsen MS, Chapin LT, Liesman JS, Daniels KM, Akers RM, Vandehaar MJ. 2008. Effects of feeding prepubertal heifers a high-energy diet for three, six, or twelve weeks on mammary growth and composition. *J Dairy Sci* 91:1926–1935.
- De Blas JC, Mateos GG. 2010. The nutrition of the rabbit, 2nd ed. Oxfordshire, UK: CABI Publishing. p 222–232.
- Denamur R. 1963. Nucleic acids of the mammary gland during gestation and lactation in the rabbit. *C R Hebd Seances Acad Sci* 256:4748–4750.
- Devinoy E, Hubert C, Jolivet G, Thepot D, Clergue N, Desaleux M, Dion M, Servely JL, Houdebine LM. 1988. Recent data on the structure of rabbit milk protein genes and on the mechanism of the hormonal control of their expression. *Reprod Nutr Dev* 28: 1145–1164.
- Flint DJ, Travers MT, Barber MC, Binart N, Kelly PA. 2005. Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1179–1187.
- Fortun-Lamothe L, Lamboley-Gauzere B, Bannelier C. 2002. Prediction of body composition in rabbit females using total body electrical conductivity (TOBEC). *Livestock Prod Sci* 78:133–142.
- Georgin P, Gouet M. 2005. Statistics using Excel 2000. Rennes: Presses Universitaires de Rennes.
- Gourdou I, Paly J, Hue-Beauvais C, Pessemesse L, Clark J, Djiane J. 2004. Expression by transgenesis of a constitutively active mutant form of the prolactin receptor induces premature abnormal development of the mouse mammary gland and lactation failure. *Biol Reprod* 70:718–728.
- Grabowski H, Le Bars D, Chene N, Attal J, Malienou-Ngassa R, Puissant C, Houdebine LM. 1991. Rabbit whey acidic protein concentration in milk, serum, mammary gland extract, and culture medium. *J Dairy Sci* 74: 4143–4150.
- Graur D, Duret L, Gouy M. 1996. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* 379:333–335.
- Guo F, Jen KL. 1995. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 57:681–686.
- Hennighausen L, Robinson GW. 2005. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 715–725.
- Houdebine LM, Djiane J, Dusanter-Fourt I, Martel P, Kelly PA, Devinoy E, Servely JL. 1985. Hormonal action controlling mammary activity. *J Dairy Sci* 68:489–500.
- Howlin J, McBryan J, Martin F. 2006. Pubertal mammary gland development: insights from mouse models. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11:283–297.
- Hu X, Juneja SC, Mailhe NJ, Cleary MP. 2002. Leptin—a growth factor in normal

- and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst* 94:1704–1711.
- Kamikawa A, Ichii O, Yamaji D, Imao T, Suzuki C, Okamatsu-Ogura Y, Terao A, Kon Y, Kimura K. 2009. Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Dev Dyn* 23:1092–1099.
- Malik NM, Carter ND, Murray JF, Scaramuzzi RJ, Wilson CA, Stock MJ. 2001. Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. *Endocrinology* 142:5198–5202.
- Nevalainen MT, Xie J, Bubendorf L, Wagner KU, Rui H. 2002. Basal activation of transcription factor signal transducer and activator of transcription (Stat5) in nonpregnant mouse and human breast epithelium. *Mol Endocrinol* 16:1108–1124.
- Park CS. 2005. Role of compensatory mammary growth in epigenetic control of gene expression. *FASEB J* 19:1586–1591.
- Picone O, Laigre P, Fortun-Lamothe L, Archilla C, Peynot N, Ponter AA, Berthelot V, Cordier A-G, Duranthon V, Chavatte-Palmer P. 2011. Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Therogenology* 75:287–299.
- Rasmussen KM, Kjolhede CL. 2004. Pre-pregnant overweight and obesity diminish the prolactin response to suckling in the first week postpartum. *Pediatrics* 113:465–471.
- Riva E, Banderali G, Agostoni C, Silano M, Radaelli G, Giovannini M. 1999. Factors associated with initiation and duration of breastfeeding in Italy. *Acta Paediatr* 88:411–415.
- Rolls BJ, van Duijvenvoorde PM, Rowe EA. 1984. Effects of diet and obesity on body weight regulation during pregnancy and lactation in the rat. *Physiol Behav* 32:161–168.
- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol* 64:355–365.
- Sejrsen K. 1994. Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle. *Proc Nutr Soc* 53:103–111.
- Sejrsen K, Purup S. 1997. Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *J Anim Sci* 75:828–835.
- Sejrsen K, Purup S, Vestergaard M, Foldager J. 2000. High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. *Domest Anim Endocrinol* 19:93–104.
- Shamay A, Pursel VG, Wilkinson E, Wall RJ, Hennighausen L. 1992. Expression of the whey acidic protein in transgenic pigs impairs mammary development. *Transgenic Res* 1:124–132.
- Silva LF, Etchebarne BE, Nielsen MS, Liesman JS, Kiupel M, VandeHaar MJ. 2008. Intramammary infusion of leptin decreases proliferation of mammary epithelial cells in prepubertal heifers. *J Dairy Sci* 91:3034–3044.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. 2006. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74:365–381.
- Stoll BA. 2000. Adiposity as a risk determinant for postmenopausal breast cancer. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:527–533.
- Thorn SR, Purup S, Cohick WS, Vestergaard M, Sejrsen K, Boisclair YR. 2006. Leptin does not act directly on mammary epithelial cells in prepubertal dairy heifers. *J Dairy Sci* 89:1467–1477.
- Thorn SR, Giesy SL, Myers MG Jr, Boisclair YR. 2010. Mammary ductal growth is impaired in mice lacking leptin-dependent signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Endocrinology* 151:3985–3995.
- Waters MJ, Daniel N, Bignon C, Djiane J. 1995. The rabbit mammary gland prolactin receptor is tyrosine phosphorylated in response to prolactin in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 270:5136–5143.